

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Adam Knetl

Syntéza proteinů obsahujících nekanonické aminokyseliny
Synthesis of proteins containing non-canonical amino acids

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli, Mgr. Václavu Vopálenskému, Ph.D., za jeho vstřícnost a trpělivost, a mé rodině a přátelům za pomoc a podporu při psaní této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2021

Adam Knetl

Abstrakt:

Nekanonické aminokyseliny umožňují vkládat nové chemické vlastnosti do proteinů, což je užitečné jak pro zkoumání stávajících proteinů, tak i pro design proteinů nových. Syntéza proteinů obsahujících nekanonické aminokyseliny se setkává s problémy efektivity translace. Tato práce se zabývá rolí genetického kódu pro kódování nekanonických aminokyselin, proteosyntézou a aminoacylací tRNA a konečně samotnými nekanonickými aminokyselinami a jejich využitím v proteinech včetně příkladů.

Klíčová slova: nekanonická aminokyselina, aminoacylace, aminoacyl-tRNA syntetáza, tRNA, genetický kód, kodón, anti-kodón

Abstract:

Non-canonical amino acids allow the introduction of new chemical properties into proteins, which is useful both for studying proteins, and designing proteins. However, the synthesis of proteins containing non-canonical amino acids faces problems with decreased effectivity of translation. This thesis examines the role of genetic code for coding non-canonical amino acids, proteosynthesis and aminoacylation of tRNA and finally the non-canonical amino acids and their application in proteins while including examples.

Key words: non-canonical amino acid, aminoacylation, aminoacyl-tRNA synthetase, tRNA, genetic code, codon, anti-codon

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod | 1 |
| 2. Genetický kód..... | 2 |
| 2.1. Rozšíření genetické abecedy | 3 |
| 2.1.1. Hydrofobní nukleotidy NaM a TPT3..... | 4 |
| 2.2. <i>Amber</i> stop kodón..... | 5 |
| 2.3. Quadrupletové a jiné kodóny | 6 |
| 2.4. Přirozené aminokyseliny..... | 7 |
| 2.5. Nekanonické aminokyseliny a jejich využití..... | 9 |
| 3. Průběh proteosyntézy..... | 12 |
| 3.1. Aminoacylace..... | 12 |
| 3.1.1. Opravy chyb při aminoacylaci | 13 |
| 4. Klíčoví účastníci proteosyntézy | 13 |
| 4.1. Ribozomy..... | 13 |
| 4.2. tRNA/aminoacyl-tRNA syntetázové páry..... | 13 |
| 4.3. tRNA..... | 13 |
| 4.4. Aminoacyl-tRNA syntetázy | 15 |
| 4.4.1. Třída I aminoacyl tRNA syntetáz..... | 16 |
| 4.4.2. Třída II aminoacyl tRNA syntetáz..... | 17 |
| 4.4.3. Ortogonalita aminoacyl-tRNA syntetáz v buňce | 18 |
| 4.4.4. Specifita syntetáz k nekanonickým aminokyselinám | 19 |
| 5. Závěr..... | 21 |
| Použitá literatura..... | 23 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|-------------|--|
| A | adenin |
| AARS | aminoacyl-tRNA syntetáza, případně XxxRS, kde Xxx je třípísmenný kód aminokyseliny rozeznávané AARS |
| AK | aminokyselina |
| Ala | alanin |
| AMP | adenosin monofosfát |
| Arg | arginin |
| Asn | asparagin |
| Asp | kyselina asparágová |
| ATP | adenosin trifosfát |
| BpyAla | (2,2'-bipyridin-5-yl)alanin |
| C | cytosin |
| CAT | chloramphenicol acetyl transferása |
| CRISPR/Cas9 | z angl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> , <i>CRISPR associated protein 9</i> , čes. nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice |
| Cys | cystein |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| G | guanin |
| Gln | glutamin |
| Glu | kyselina glutamová |
| Gly | glycin |
| His | histidin |
| Ile | isoleucin |
| iodoPhe | p-iodo-L-phenylalanin |
| Leu | leucin |
| Lys | lysin |
| Met | methionin |
| mRNA | mediátorová RNA |
| OTS | ortogonální translační systémy |
| PACE | z angl. <i>Phage Assisted Continuous Evolution</i> , čes. bakteriofágem asistovaná kontinuální evoluce |
| PEG | polyethylen glykol |
| Phe | phenyl-alanin |
| Ppi | pyrofosfát |
| Pro | prolin |
| RF1 | z angl. <i>release factor 1</i> , čes. uvolňovací faktor 1 |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| Ser | serin |
| T | thymin |
| Thr | treonin |
| tRNA | transferová RNA |
| Trp | tryptofan |
| Tyr | tyrosin |
| U | uracil |
| Val | valin |

1. Úvod

Proteiny, jakožto jedny ze základních stavebních bloků a funkčních prvků buněk, jsou častým nástrojem nebo produktem v biotechnologiích. Možnost cíleně do proteinů vložit aminokyselinu (dále i AK) dle vlastního návrhu, nejlépe na libovolné místo řetězce, je mimořádně užitečná technika slibující široké spektrum využití, ať už pro zkoumání proteinů stávajících, které jsou dlouhodobě studovány, nebo pro návrh proteinů s novými vlastnostmi. Aminokyseliny vlastního návrhu nevyskytující se přirozeně v organismech dále nazývám nekanonické aminokyseliny. První práce představující techniku pro začlenění nekanonické aminokyseliny do proteinu s využitím aminoacyl-tRNA syntetázy (dále AARS) byla publikována v roce 2001 (Wang, 2001). Od té doby bylo představeno mnoho dalších nekanonických aminokyselin, které byly začleněny do proteinů. Rozšiřující se spektrum chemických vlastností k dispozici pro využití v proteinech otevírá nové možnosti pro další výzkum i pro vývoj nových proteinů.

Techniky vložení aminokyselin do proteinů jsou neodmyslitelně spojeny s genetickým kódem a vyžadují nové volné kodóny, které je možné získat buď uvolněním některých stávajících kodónů z už přítomných 64 (Wang, 2001), či vytvořením kodónů zcela nových (Hohsaka, 1996; Magliery, 2001; Fischer, 2020).

V průběhu proteosyntézy jsou techniky začlenění aminokyselin do vznikajících proteinů spjaty s enzymy z rodiny aminoacyl-tRNA syntetáz. Úpravou konkrétní aminoacyl-tRNA syntetázy pro rozeznávání nekanonické aminokyseliny, tedy takové, které nepatří mezi 21 aminokyselin běžně se v proteinech vyskytujících, je možné navázat tuto nekanonickou aminokyselinu se specifickými vlastnostmi na transferové RNA (dále tRNA) nesoucí volný anti-kodón, který neodpovídá žádnému kodónu využívanému buňkou. Kodón odpovídající tomuto anti-kodónu je potom vložen na zamýšlené místo do mediátorové RNA (dále mRNA) a do translatovaného proteinu se na odpovídající místo začlení aminokyselina s požadovaným uhlíkovým zbytkem (Wang, 2001).

Nekanonické aminokyseliny s různými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, například nesoucí oxoskupinu (Costa, 2018), jsou v proteinech poté využívány při konstrukci nových proteinů (Drienovská, 2015), při vývoji léčiv (Cho, 2011), pro značení proteinů (Wang, 2006) a jako vazebná místa pro další modifikace (Lim, 2015).

V této práci se budu věnovat třem hlavním oblastem, které se týkají začlenění nekanonických aminokyselin do proteinů. Zaprvé genetickému kódu, kde představím způsoby získání nových kodónů pro kódování nekanonických aminokyselin. Rozebrané metody jsou následující: potlačení *amber* stop kodónu (Wang, 2001; Lajoie, 2013) a rozšíření genetického kódu o dva nukleotidy s novými bázemi (Fischer, 2020). Druhá zkoumaná oblast je proteosyntéza a aminoacylace tRNA. Zde se také věnuji přípravě aminoacyl-tRNA syntetáz specifických k příslušným nekanonickým aminokyselinám (Xie, 2005; Bryson, 2017). Třetí oblastí jsou pak samotné nekanonické aminokyseliny a jejich využití v proteinech. Tato práce uvádí několik příkladů, jak byly nekanonické aminokyseliny, které už byly výše uvedeny, použity v různých oblastech biologie při přípravě proteinů. Jedná se o následující aplikace: přípravu nového metaloenzymu, kdy vložená aminokyselina zprostředkovává vazbu kovového iontu k proteinu (Drienovská, 2015), nekanonickou aminokyselinu s fluorescenčně aktivním aromatickým jádrem pro značení proteinů (Wang, 2006), nekanonickou aminokyselinu obsahující atom jódu pro studium struktury proteinů rentgenovým zářením (Xie, 2004) a využití nekanonických aminokyselin při vývoji proteinových léčiv pro prodloužení jejich doby života (Lim, 2015; Cho, 2011) nebo pro uvolnění léčiva v cílové buňce (Costa, 2018).

2. Genetický kód

Genetický kód představuje pravidla, podle kterých je genetická informace uložená v deoxyribonukleové kyselině (dále DNA) přepisována přes ribonukleovou kyselinu (dále RNA) do sledu aminokyselin, tedy proteinů. Výjimku tvoří RNA viry, které genetickou informaci ukládají do RNA. Genetická informace je v DNA uchovávána jako pořadí deoxyribonukleotidů v řetězci molekuly DNA. V přírodě využívá buňka k tomuto účelu čtyři deoxyribonukleotidy s bázemi adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G) spojené fosfodiesterovými vazbami. Báze spolu párují na základě nekovalentních interakcí, páry tvoří vždy A/T (nebo A/U v ribonukleotidech) a C/G). Správné párování nukleotidů je nutné pro průběh replikace DNA, transkripce i během translace, kdy spolu párují kodón a anti-kodón.

Informace zapsaná v DNA je poté přepsána do RNA. V RNA je místo thyminu použit uracil (U). Informace z RNA je dále využita v průběhu proteosyntézy pro správné zařazení aminokyselin do vznikajícího peptidu. Genetický kód je tripletový, tedy každé tři znaky odpovídají jedné aminokyselině. Teoreticky je možné kódovat 4^3 , tedy 64 aminokyselin, nicméně genetický kód je degenerovaný a některé aminokyseliny jsou kódovány více kodóny,

celkem je takto využitých 61 kodónů. Zbývající tři kodóny, $5'UAA^{3'}$, $5'UAG^{3'}$ a $5'UGA^{3'}$ jsou využity na ukončení translace – takzvané stop kodóny.

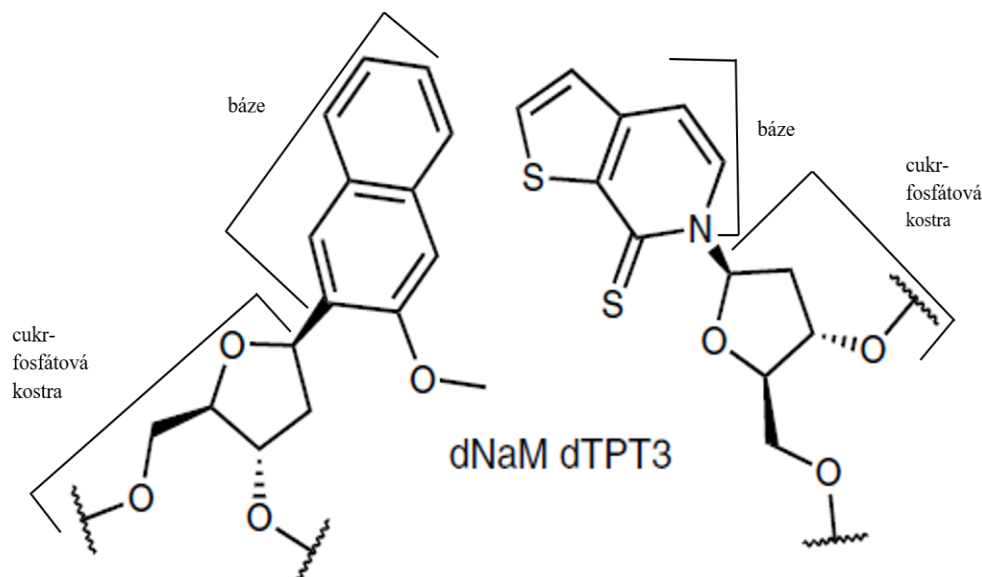
Pokud chceme v průběhu proteosyntézy začlenit do nově vznikajícího proteinu nové nekanonické aminokyseliny, je nutné pro ně připravit unikátní kodón specifický pro konkrétní nekanonickou aminokyselinu. Jelikož všech 64 kodónů již má v buňce využití, byly vyvinuty metody umožňující význam některých kodónů změnit či vytvořit kodóny zcela nové. Velmi využívaným přístupem je umlčování stop kodónů, nejčastěji takzvaného *amber* stop kodónu ($5'UAG^{3'}$), a nahrazení jejich významu obvykle nekanonickou aminokyselinou (Manandhar, 2021). Další cestou k rozšíření genetického kódu je vývoj modifikovaného ribozomu, který umožňuje překlad kodónů složených ze čtyř nukleotidů (Anderson, 2004), případně je také možné vytvořit nový pár nukleotidů a modifikovat hostitelský organismus organismu, který je schopen tyto nukleotidy stabilně udržet ve svém genomu a následně je využít pro proteosyntézu (Zhang, 2017b).

2.1. Rozšíření genetické abecedy

Pro úspěšné rozšíření genetické abecedy ze čtyř na více znaků je nutné, aby umělé nukleotidy byly stabilně udržované hostitelským organismem a prošly všemi kroky předcházejícími translaci, tedy replikací a transkripcí, a poté plnily úspěšně funkci nukleotidů v interakci kodón/antikodón při vlastní translaci. Ze snah o přípravu umělých nukleotidů lze vyzdvihnout především tři sady umělých nukleotidů. Jsou to tzv. Hajimoji DNA vyvinuté Bennerovým týmem (Yang, 2006), hydrofobní nukleotidy vyvinuté Hiraovým týmem (Lee, 2018) a nukleotidy NaM a TPT3, jež jsou výsledkem práce Romesbergova týmu (Fischer, 2020). Práce prvních dvou z těchto týmů se nezaměřuje primárně na funkčnost jimi vytvořených nukleotidů v proteosyntéze, ale především na přípravu DNA aptamerů používaných pro diagnostiku a terapeutické značení například rakovinných buněk (Kimoto, 2020). V případě NaM a TPT3 nukleotidů byla prozkoumána aplikace *in vivo* v semi-syntetickém organismu, upravené bakterie *Escherichii coli*, vyvinuté speciálně pro využití těchto umělých nukleotidů (Fischer, 2020). Podrobněji budou rozebrány především umělé nukleotidy NaM a TPT3.

2.1.1. Hydrofobní nukleotidy NaM a TPT3

Nukleotidy NaM a TPT3 splňují výše uvedené podmínky udržení v hostitelském organismu během replikace transkripce i translace. Báze těchto molekul jsou hydrofobní a párují pomocí sterických interakcí (Obrázek 1).



Obrázek 1 Chemické struktury umělých párů bází nukleotidů dNaM a dTPT3 v řetězci DNA. Jedná se o hydrofobní aromatické molekuly, které párují pomocí sterických interakcí (Fischer, 2020).

Nukleotidy dNaM a dTPT3 byly úspěšně využity pro produkci proteinu za použití speciálně modifikované transferové RNA (tRNA), umožňující pročtení kodónu s umělým nukleotidem (Zhang, 2017a). Umělé nukleotidy NaM a TPT3 byly dopraveny do bakterie *Escherichie coli* pomocí na expresním plazmidu lokalizovaného transportérového proteinu *PtNTT2*, původem z rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* (Fischer, 2020). Párování nukleotidů NaM a TPT3 umožňuje jak replikaci, tak i transkripci v organismech obsahujících NaM a TPT3 v DNA. Aby se umělé nukleotidy v hostitelském organismu udržely stabilně během replikace, byl využit *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPER associated protein 9* (CRISPR/Cas9 systém), cílený pomocí dvou tzv. *single-guide* RNA na DNA sekvence vznikající po nejčastějších mutacích vedoucích ke ztrátě umělých nukleotidů (změna dNaM/dTPT3 na dA/dT a bodová deleční mutace v místě umělých nukleotidů). Po rozpoznání sekvence, která ztratila umělé nukleotidy, CRISPR/Cas9 systémem, je tato sekvence rozštěpena na obou vláknkách a následně je plazmid, na kterém tato sekvence byla, zcela degradován (Zhang, 2017b). Pro udržení umělých nukleotidů NaM a TPT3 v chromosomu je možné využít modifikované buňky s delecí genu *recA*, který se podílí

v *Escherichii coli* na opravách DNA po replikaci, a nadprodukcí DNA polymerázy II. Tyto dvě modifikace dohromady mohou zajistit zachování více než 55 % umělých nukleotidů v genomu po 137 generacích (Ledbetter, 2018).

Aby bylo možné prozkoumat schopnost nukleotidů NaM a TPT3 plnit svou roli v interakci kodón/anti-kodón, byly připraveny kodóny obsahující umělé nukleotidy na první, druhé a třetí pozici kodónu a odpovídající nukleotid na protější pozici v anti-kodónu. Ukázalo se, že umělé nukleotidy lokalizované na první pozici kodónu nejsou při translaci příliš efektivní, ale kodóny obsahující NaM na druhé pozici kodónu s TPT3 na druhé pozici v anti-kodónu se překládají úspěšně. Dále se pak úspěšně překládají i některé kodóny s NaM v kodónu samopárující s NaM na odpovídající pozici v anti-kodónu. Celkem bylo zatím identifikováno sedm párů kodón/anti-kodón vytvořených s umělými ribonukleotidy, $5'GXC^{3'}/5'GYC^{3'}$, $5'GXT^{3'}/5'AYC^{3'}$, $5'AXC^{3'}/5'GYT^{3'}$, $5'AGX^{3'}/5'XCT^{3'}$, $5'CGX^{3'}/5'XCG^{3'}$, $5'TGX^{3'}/5'XCA^{3'}$ a $5'TTX^{3'}/5'XAA^{3'}$, (kde X je NaM a Y je TPT3), které jsou dostatečně selektivní a umožňují efektivní translaci nekanonických aminokyselin (Fischer, 2020). Tyto výsledky naznačují možnost využití NaM a TPT3 pro rozšíření možných kodónů z 64 na celkem 73. Konkrétně kombinace kodón/anti-kodón $5'AXC^{3'}/5'GYT^{3'}$, $5'GXT^{3'}/5'AYC^{3'}$ a $5'AGX^{3'}/5'XCT^{3'}$ byly dále testovány ve smyslu vzájemné ortogonalitě a bylo demonstrováno, že tyto tři kodóny s odpovídajícími ortogonálními translačními systémy (OTS), neboli tRNA a aminoacyl-tRNA syntetázovým párem, který neinteraguje s ostatními tRNA a aminoacyl-tRNA syntetázami v buňce, je možné využít pro současnou inkorporaci tří nekanonických aminokyselin do proteinu *in vivo* bez vzájemných interakcí mezi sebou způsobujících vzájemné záměny (Fischer, 2020). Vlastnosti OTS jsou blíže popsány v kapitole 4.4.3. Jeden z potenciálních problémů NaM a TPT3 může být nechtěné párování samo se sebou během replikace a transkripce, které by způsobilo nevyhnutelnou ztrátu informace a dále jistá destabilizace helixu DNA obsahujícího tyto hydrofobní báze, které mezi sebou nemají vodíkové můstky (Hettinger, 2017). Nicméně, jak bylo již výše uvedeno, informace uchovaná v NaM a TPT3 se v buňkách *Escherichie coli* drží s využitím jistých delečních mutací a CRISPR/Cas9 systému po mnoho generací (Zhang, 2017a; Ledbetter, 2018).

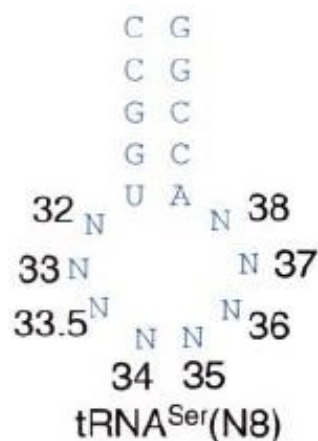
2.2. Amber stop kodón

Amber stop kodón byl první kodón využitý pro kodování nekanonické aminokyseliny *in vivo* v bakteriální buňce (Wang, 2001). Tato metoda umožňuje přesné začlenění jedné nekanonické aminokyseliny do proteinu během proteosyntézy. Nicméně tRNA^{CUA}, která *amber*

stop kodón dekóduje jako nekanonickou aminokyselinu během translace, soutěží s uvolňovacím faktorem RF1 (*release factor* RF1), jenž v reakci na *amber* stop kodónu ukončuje translaci (Scolnick, 1968). Tato kompetice tRNA^{CUA} s RF1 snižuje efektivitu translace genů obsahujících *amber* stop kodón. Jelikož zvýšení efektivitu potlačování *amber* stop kodónu by mohlo vést ke snížení *fitness* bakterie, pro zvýšení efektivitu translace byl vytvořen kmen *Escherichie coli* s všemi výskyty *amber* stop kodónu nahrazenými *ochre* stop kodónem a delecí RF1 z genomu bakterie (Lajoie, 2013).

2.3. Quadrupletové a jiné kodóny

Molekuly tRNA překládající quadrupletový kodón místo standardního kodónu tripletového se vyskytují v přírodě u některých kmenů bakterií jako mechanismus potlačující +1 *frameshift* mutaci na mRNA (Riddle, 1973; Atkins, 1991). Pro začlenění aminokyseliny do proteinu během proteosyntézy byla tRNA dekódující quadrupletový kodón využita například *in vitro* v roce 1996 (Hohsaka, 1996). *In vivo* pak byla tato metoda využita například v roce 2001, kdy byly zkoumány potenciální quadrupletové kodóny. Kodóny 5'AGGA^{3'}, 5'UAGA^{3'}, 5'CCCU^{3'} a 5'CUAG^{3'} byly identifikované jako kodóny, které je možné využít jako volné kodóny pro začlenění nekanonických aminokyselin (Magliery, 2001). Quadrupletový anti-kodón molekuly tRNA má čtvrtou bázi na nukleotidu na pozici značené jako 33,5, jak je vidět na obrázku 2, což zajišťuje zachování tradičního značení nukleotidů zbytku molekuly tRNA.



Obrázek 2 Číslování bází akceptorového ramene tRNA dekódující quadrupletový kodón. N odpovídá jakékoliv bázi. Anti-kodón tvoří nukleotidy 33,5 až 36, kde báze 33,5 je přidaná báze. Převzato z (Magliery, 2001).

Efektivní překládání kodónů, které rozeznávají quadrupletové kodóny, by potenciálně vedlo k posunu čtecího rámce v mnoha genech a mohlo by silně poškodit *fitness* nositelů takových genů. Proto další výzkum vedl ke způsobům, jak odstranit letalitu efektivní implementace této metody. Jedna z těchto metod využila kmen *Escherichie coli* se všemi kopiemi *amber* stop kodónu nahrazenými *ochre* stop kodónem (zmíněné v kapitole 2.2) (Lajoie, 2013) a zkoumala schopnost upravené tRNA překládat kodóny $5'UAGN^3'$ (N = A, U, C, G) (Wang, 2016). Práce mimo jiné obsahuje překvapivé výsledky ohledně anti-kodónů. Všechny tRNA, nehledě na jimi preferenčně dekódované kodóny, měly $5'UCUA^3'$ anti-kodón (Wang, 2016). Další cestou k oddělení efektivní translace quadrupletových kodónů od běžného chodu buňky je pak vytvoření ortogonálních ribosomů a mRNA. Vložení ribosomů nepodílejících se na správném chodu buňky v tomto případě umožňuje ribosom mutovat a zvyšovat efektivitu translace quadrupletových kodónů bez toho, aby tyto změny byly pro buňku toxické, či dokonce letální (Wang, 2007). Tímto přístupem bylo možné využít až tři odlišných quadrupletových kodónů pro začlenění různých nekanonických aminokyselin do jednoho proteinu (Neumann, 2010; Dunkelmann, 2020).

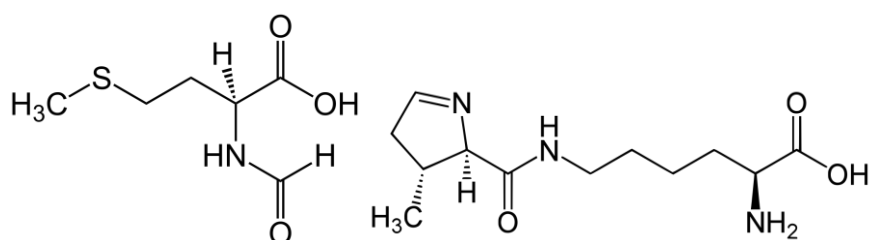
Jedna ze zajímavých možností využití výše uvedených přístupů je také možnost kontrolovat replikaci virů, která byla využita pro úpravu viru HIV, který se díky mutaci vkládající $5'UAGA^3'$ kodón dekódovaný speciální tRNA nemůže množit bez přítomnosti nekanonické aminokyseliny. Quadrupletový kodón je v tomto případě bezpečnější a odolnější mutacím než původně využívaný tripletový *amber* stop kodón (Chen, 2018).

2.4. Přirozené aminokyseliny

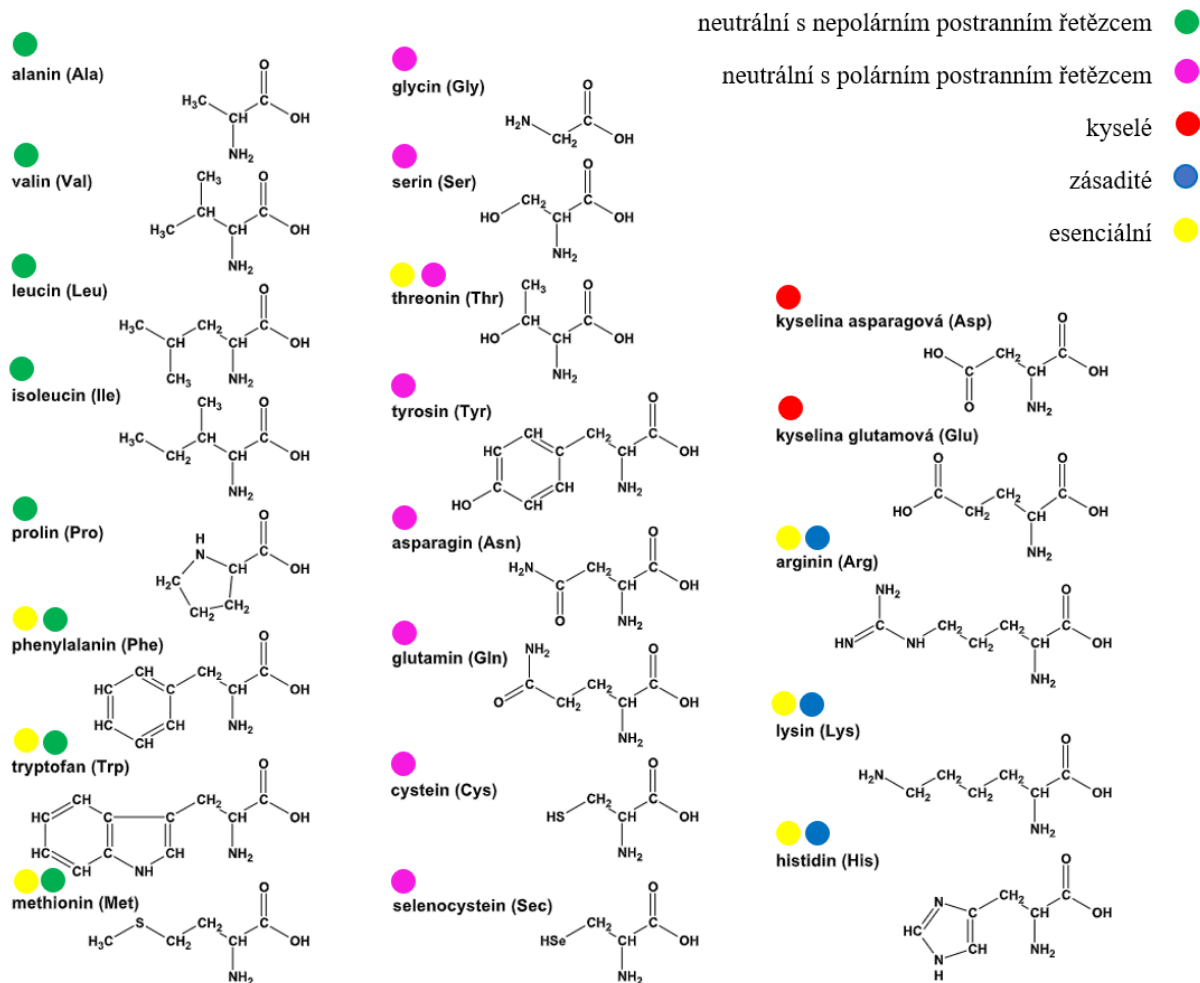
Struktura proteinu se dělí na primární strukturu, sekundární strukturu, terciární strukturu a kvartérní strukturu. Primární struktura je tvořena pořadím aminokyselin kondenzovaných do řetězce, který se postupným prodlužováním mění z peptidu na polypeptid a nakonec na protein. Aminokyseliny jsou molekuly nesoucí aminoskupinu a karboxylovou skupinu zároveň. α -aminokyseliny tvořící proteiny mají základní strukturu aminokyseliny, α uhlíku a karboxylové skupiny s postranním uhlíkatým řetězcem navázaným na α uhlíku. Při syntéze nového proteinu se vznikající řetězec prodlužuje kondenzací spojující karboxylovou skupinu stávajícího řetězce a aminoskupiny nově připojované aminokyseliny. Dvacet α -aminokyselin je základními stavebními kameny proteinů v živých systémech. Kromě těchto dvaceti se v buňkách mohou vyskytnout ještě další tři. N-formylmethionin je využíván v bakteriích při iniciaci translace (Noll, 1972), dále se můžeme setkat se selenocysteinem, který je využíván pro svůj redoxní

potenciál v antioxidačních reakcích (Byun, 2011; Tinggi, 2008). V metanogenních bakteriích a archae se pak vyskytuje pyrolysin (Srinivasan, 2002).

Proteinogenní aminokyseliny jsou členěny podle vlastností jejich postranní skupiny. Podle náboje rozeznáváme aminokyseliny neutrální a nabitě, kyselé a zásadité. Podle polaritý postranního řetězce je pak dělíme na polární a nepolární. Dále jsou některé aminokyseliny aromatické. Mezi nenabitě s nepolárním řetězcem se řadí alanin (Ala), valin (Val), leucin (Leu), izoleucin (Ile), prolin (Pro), phenylalanin, tryptofan (Trp) a methionin (Met). Nenabitě aminokyseliny s polárním řetězcem jsou glycin (Gly), serin (Ser), threonin (Thr), tyrosin (Tyr), asparagin (Asn), glutamin (Gln), cystein (Cys) a selenocystein. Kyselé aminokyseliny jsou kyselina asparagová (Asp) a kyselina glutamová (Glu), zásadité aminokyseliny jsou arginin (Arg), lysin (Lys) a histidin (His). Aromatické jádro mají phenylalanin, Trp, Tyr a His. Struktury aminokyseliny jsou zobrazeny na obrázcích 3 (N-formylmethionin a pyrolysin) a 4 (dvacet základních aminokyselin a selenocystein).



Obrázek 3: Zleva do prava struktura N-formylmethioninu a pyrolysinu. Obrázky převzaty z [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:\(S\)-N-Formylmethionine_V.1.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:(S)-N-Formylmethionine_V.1.svg), <https://cs.m.wikipedia.org/wiki/Soubor:Pyrrolysine.svg>.



Obrázek 4: Struktura dvaceti základních proteogenních aminokyselin a selenocysteinu. Převzato z http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_bilkoviny.html.

2.5. Nekanonické aminokyseliny a jejich využití

S cílem rozšíření chemismu proteinů bylo vyvinuto mnoho nekanonických aminokyselin s AARS umožňujícími jejich začlenění. Byly využity například při konstrukci nových enzymů (Drienovská, 2015), cílení léčiv či samotných léčivých účinků (Costa, 2018) a značení proteinů pro výzkum (Wang, 2006).

Jeden z příkladů nekanonických aminokyselin je například fluorescenční L-(7-hydroxycourmarin-4-yl) ethylglycin, α -aminokyselina nesoucí na svém uhlíkatém zbytku aromatické jádro absorbující ve vlnové délce zhruba 340 nm s fluoreskujícím maximem ve vlnové délce 440 nm. Mezi další užitečné vlastnosti této aminokyseliny patří také její citlivost na změny pH. Tato aminokyselina byla úspěšně začleněná pomocí umlčování *amber* stop kodónu do struktury myoglobinu bez pozorovatelného narušení stability myoglobinu a zároveň bylo možné podle síly fluorescence sledovat narušení sbalení proteinu při zvyšování

koncentrace ureázy v roztoku, demonstrující užitečnost této nekanonické aminokyseliny pro studium struktury proteinů (Wang, 2006).

Některé nekanonické aminokyseliny mohou být použity pro chelataci iontů kovů. Aminokyselina (2,2'-bipyridin-5-yl)alanin (BpyAla) vážící přechodné ionty kovů, jako například $\text{Fe}^{2+/3+}$, Cu^{2+} , $\text{Co}^{2+/3+}$ a $\text{Ru}^{2+/3+}$, byla za pomoci aminoacyl-tRNA syntetázy původně z *Methanococcus jannaschii* s tRNA^{CUA} vnesena do proteinu pomocí potlačení *amber* stop kodónu (Xie, 2007). Upravená AARS byla získána dvěma koly selekcí. Dvě kola selekce byla nutná, jelikož první randomizované knihovny negenerovaly žádné AARS schopné navázat BpyAla. Pro první kolo selekcí byl tedy zvolen analog BpyAla, biphenylalanin, a AARS rozeznávající biphenylalanin pak byla použita pro vytvoření nové randomizované knihovny AARS, ze které byly následně selektovány varianty AARS rozeznávající BpyAla. U lysozymu kódovaného bakteriofágem T4 s mutací i A⁸²BpyAla byla poté ověřena schopnost vázat ionty Cu^{2+} pocházející z CuCl_2 přítomného v médiu. Zatímco v případě mutanta A⁸²BpyAla byla při hmotnostní spektroskopii identifikována dvě hmotnostní maxima, tedy proteiny s navázaným iontem mědi a bez tohoto iontu, v kontrolním vzorku s mutací A⁸²Y bylo identifikováno pouze jedno hmotnostní maximum, indikující, že kontrolní vzorek nevázal ionty v médiu (Xie, 2007). Aminokyselina BpyAla byla poté později využita i při vývoji nového metaloenzymu, konkrétně upraveného transkripčního faktoru bakterie *Lactococcus lactis*, dimeru, na jehož dimerovém rozhraní bylo vytvořeno aktivní místo s navázanými komplexy vázajícími ionty mědi (Drienovská, 2015). Inkorporace BpyAla umožnila v tomto případě přeskočit několik kroků post-translačních úprav, konkrétně konjugaci komplexů schopných vázat kovové ionty na cysteinové zbytky, nutných pro kompletní syntézu nového metaloenzymu. Po ověření úspěšné přípravy výše uvedeného enzymu byla analyzována jeho katalytická funkce, kdy za přítomnosti iontu mědi nový metaloenzym katalyzoval Friedel-Craftsovu reakci, tedy navázání substituentu na aromatické jádro, 5-methoxy-1H-indolu s 1-(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)but-2-en-1-onem. Ve většině případů měly mutace enzymu obsahující BpyAla nižší úroveň konverze substrátů na produkt, mezi 18 až 36 %. Nicméně zároveň byla zaznamenána chirální selektivita vedoucí k většímu enantiomernímu přebytku produktu mezi 22 až 49 %. Nejlepší dosažený výsledek byla 94% konverze 2-methyl indolu s 1-(1-methyl-1H-imidazol-2-yl)but-2-en-1-onem na sloučený opticky aktivní produkt s 83% enantiomerním přebytkem. Zajímavé také je, že i pouhá změna umístění BpyAla mutací aminokyseliny M⁸⁹X nebo N¹⁹X místo F⁹³X v proteinu umožňuje kontrolovat stereochemické vlastnosti aktivního místa, kdy mutace M⁸⁹X a N¹⁹X

tvořily především (+) variantu enantiomeru, zatímco mutace F⁹³X katalyzovala více vznik (-) varianty (Drienovská, 2015).

Nekanonická aminokyselina p-azido-L-phenylalanin po začlenění do monomeru glutathionin-S-transferázy, dimeru skládajícího se ze dvou identických podjednotek (Chin, 2002) podle (Maru, 1996; McTigue, 1995) umožňuje po aktivaci UV zářením kovalentně propojit interagující podjednotky. Při ověřování funkčnosti této aminokyseliny bylo kovalentně propojeno v reakci na UV záření 10-30 % glutathionin-S-transferázy v roztoku, zatímco v kontrolním vzorku nativních proteinů neobsahujících p-azido-L-phenylalanin nebyla pozorována žádná kovalentní interakce (Chin, 2002).

Dalším příkladem využití nekanonických aminokyselin je při studiu struktury proteinu rentgenovými paprsky začlenění těžkého atomu, například atomu jódu, do proteinu za účelem rozptýlení záření, což představuje řešení fázového problému. Oproti jiným metodám umožňují nekanonické aminokyseliny vnést atom jódu do proteinu na specifickou pozici a v přesně definovaném množství. Při studiu struktury lysozymu bakteriofága T4 rentgenovými paprsky rozptyloval jód v začleněné aminokyselině p-iodo-L-phenylalaninu (iodoPhe) namísto cysteinu či methioninu rentgenové paprsky lépe a poskytl tak kvalitnější data (Xie, 2004). Zároveň díky faktu, že nekanonické aminokyseliny je možné do proteinů začlenit na více pozic, by neměla být velikost proteinů limitujícím faktorem. Dále je důležité, že při začlenění iodoPhe do hydrofobického jádra proteinu nebylo zaznamenáno žádné narušení struktury (Xie, 2004).

Při vývoji léčiv byl p-acetylphenylalanin využit pro navázání polyethylen glykolu (PEG) (Cho, 2011) a p-azido-L-phenylalanin byl využit pro konjugaci s lidským albuminem (Lim, 2015) pro maskování proteinových léčiv a tím prodloužení jejich poločasu rozpadu bez snížení jejich bioaktivity.

Velká flexibilita bioortogonálních reakčních skupin některých nekanonických aminokyselin byla využita při konstrukci polypeptidů, které tvoří nanometrové proteinové micely složené z opakující se sekvence pěti aminokyselin, jež byly vyvinuty pro ochranu léčiv s nízkou molekulární hmotností. V těchto peptidech p-acetylphenylalanin nahradil funkci chemicky aktivního lysinového, případně cysteinového zbytku, které ovšem mohly reagovat zároveň i s doménami proteinů využívaných pro cílení léčivé látky. Ketonová skupina p-acetylphenylalaninu byla využita pro kovalentní navázání účinné látky doxorubicinu do proteinové micely bez hrozby navázání se na chemicky aktivní aminokyseliny proteinových

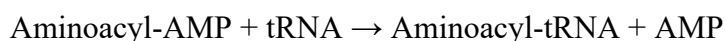
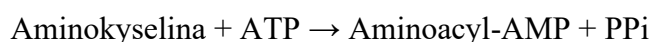
domén používaných pro cílení léčiv (Costa, 2018). Další výhodou využití p-acetylphenylalaninu je navázání doxorubicinu přes oximovou vazbu, která se rozpadá v kyselém prostředí, což umožňuje uvolnění doxorubicinu v kyselém prostředí lysosomů (Costa, 2018).

3. Průběh proteosyntézy

Proteosyntézu, tedy proces, při kterém se řetězí aminokyseliny do proteinů, je možné rozdělit na dvě fáze. Než ribozom a iniciační faktory iniciují translaci, musí být aminokyseliny nejprve navázány na tRNA. Tento proces se nazývá aminoacylace, případně „nabíjení“ tRNA, neboť je na tRNA navázána aminokyselina vysoko-energetickou vazbou, jejíž energie je potom využita v proteosyntéze během elongace (Ibba, 2000).

3.1. Aminoacylace

V tomto kroku proteosyntézy probíhá párování aminokyseliny s jí odpovídajícím anti-kodónem. Pro přesnost translace je aminoacylace stejně důležitá, jako párování bází v ribosomu (Lee, 2006; Nangle, 2002). Aminoacylace se účastní tRNA, příslušná aminokyselina a aminoacyl-tRNA syntetáza, která mají za úkol první dva aktéry správně spárovat. AARS rozpozná odpovídající aminokyselinu, valenčně na ní naváže adenosin monofosfát (dále AMP) pomocí energie získané odštěpením pyrofosfátu (PPi) z donorové molekuly adenosin trifosfátu (dále ATP), a poté rozpozná odpovídající tRNA a přesune vazbu na akceptor stem molekuly (Ibba, 2000; Perona, 2002). Aminoacylace se skládá ze dvou reakcí a probíhá podle níže uvedených vztahů.



AARS nejprve v buňce vyhledá molekulu ATP, a na ní poté naváže odpovídající aminokyselinu. Během první reakce se uvolňuje pyrofosfát. Vzniklý adenylát-aminokyselinový komplex je poté s pomocí tRNA syntetázy přesunut k požadované tRNA a aminokyselina je přenesena z AMP na akceptorový helix molekuly tRNA. Finální pozice aminokyseliny na tRNA je na 3'-OH skupině posledního nukleotidu molekuly tRNA na 3' konci (Ibba, 2000; Banik, 2012).

Jelikož aminokyseliny vstupují do proteosyntézy navázané na tRNA, kam byly připojeny aminoacyl-tRNA syntetázami, a v dalších krocích už je kontrolován pouze správný anti-kodón tRNA, je možné nabít tRNA modifikovanou AARS a aminoacylovanou tRNA poté použít pro syntézu proteinů obsahujících nekanonické AK s využitím proteosyntetického aparátu buňky.

3.1.1. Opravy chyb při aminoacylaci

Vzhledem k faktu, že kterákoliv chyba, která se v tomto procesu vyskytne, se následně už bez kontroly objeví v syntetizovaných proteinech (Lee, 2006) (Bacher, 2007), mnoho aminoacyl-tRNA syntetáz má i editační aktivitu, do jisté míry analogickou DNA polymerázové kontrole replikace (Francklyn, 2008). V případě, že opravnou aktivitu enzym nemá, kompenzuje silnější selekcí, aby udržel chybovost na pro buňku přijatelné úrovni, podobné jako u AARS, které kontrolní mechanismus mají, tedy řádově při jedné ze sta tisíc aminoacylací (Ling, 2009).

4. Klíčoví účastníci proteosyntézy

4.1. Ribozomy

Ribozomy katalyzují v buňce spojování aminokyselin do proteinů (Hiller, 2011). Jsou složeny z ribonukleové kyseliny a proteinů. Při syntéze proteinů jim mRNA slouží jako templát pro vznikající protein a tRNA zprostředkovává přísun stavebního materiálu (aminokyselin) a dekoduje informaci nesenou mRNA.

4.2. tRNA/aminoacyl-tRNA syntetázové páry

Každá tRNA má svou příslušnou aminoacyl-tRNA syntetázu, která je zodpovědná za její aktivaci aminokyselinou, aby se mohla účastnit elongační fáze proteosyntézy. Níže jsou oba členové těchto párů blíže rozebráni i vzhledem k jejich vzájemné interakci.

4.3. tRNA

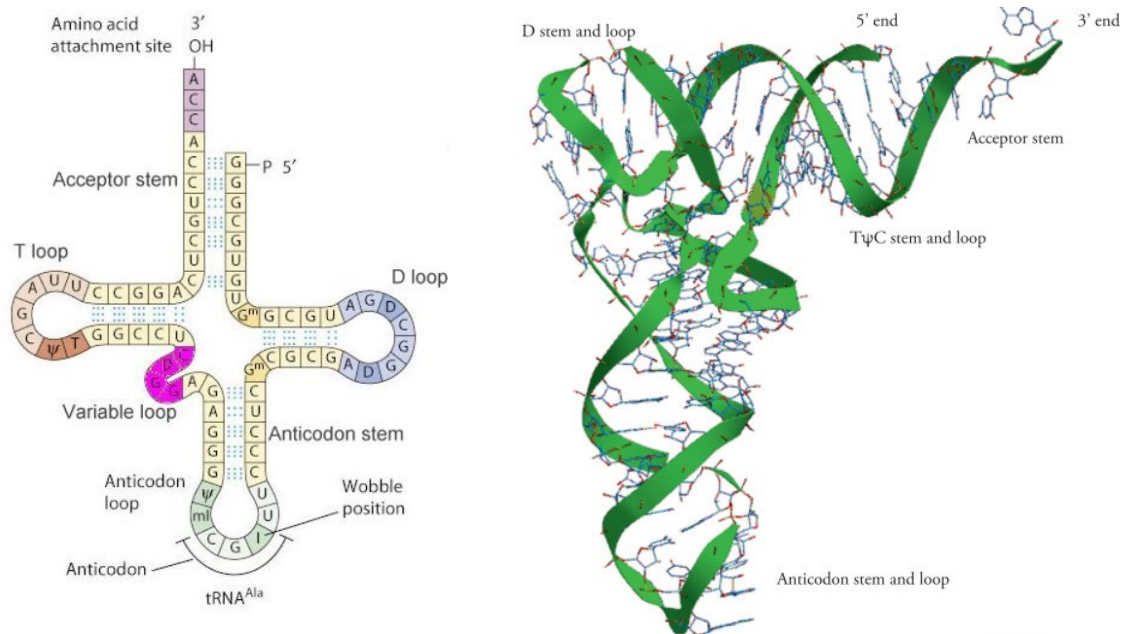
Transferové RNA jsou molekuly vnášející aminokyseliny do ribosomu během proteosyntézy. Molekuly tRNA mají ve své sekvenci anti-kodóny odpovídající kodónům na mRNA. V ribozomu prostřednictvím párování s mRNA určují pořadí aminokyselin tak, jak je v mRNA zakódováno. Molekula tRNA je jednovláknová RNA. Toto vlákno na několika

místech páruje samo se sebou, čímž vytváří smyčky. Strukturu RNA lze hierarchicky popsat jako primární, sekundární a terciární. Primární strukturou se rozumí pořadí ribonukleotidů v řetězci. Sekundární struktura je definována především párováním bází. Terciární strukturu potom tvoří uspořádání v prostoru, stabilizované interakcemi ribózo-fosfátové kostry a dalšími faktory.

Pro primární strukturu tRNA je charakteristická délka řetězce 70 až 96 nukleotidů (Zamudio, 2018; Giegé, 1993). Typické čtyři ribonukleotidy doplňují báze neobvyklé, jako například inosin a dihydrouridin, které mají specifické vlastnosti, uplatňující se například při párování s kodónem, kdy umožňují jedné molekule tRNA rozeznat více kodónů určujících odpovídající aminokyselinu. Inosin hraje významnou roli v párování bází v anti-kodónu. Dihydrouridin je pyrimidinový nukleosid odvozený z uracilu, který lokálně destabilizuje strukturu řetězce a tím umožňuje snazší formování smyček, či podporuje pohyblivost řetězce RNA, například při nižších teplotách (Dalluge, 1996). Sekundární struktura tRNA tvarem připomíná jetelový list. Sestává z úseků, kde se báze vzájemně párují, a z úseků, které tvoří volné smyčky. Obvykle jde o čtyři hlavní ramena či smyčky a jednu drobnou variabilní smyčku (Giegé, 1993). Nejbližší 5' konci tRNA se nachází tzv. D smyčka, jejíž název je odvozen od dvou dihydrouridinů, které se v ní nachází (McCloskey, 1977). Následuje anti-kodónové rameno s anti-kodónovou smyčkou a samotným anti-kodónem, antiparalelní sekvencí ke kodónu na mRNA. Anti-kodón může obsahovat inosin na poslední pozici, často označované pro svou schopnost rozeznat více bází jako tzv. *wobble* pozice. Inosin rozpoznává a páruje se s cytosinem, adeninem a uracilem (McCloskey, 1977). Důležitá pro identifikaci tRNA během aminoacylace je variabilní smyčka, ve struktuře následuje za T smyčkou ve směru k 5'. Variabilní smyčka je specifická pro tRNA a její délka má rozsah od několika málo do více než deseti nukleotidů. Tato smyčka je také zodpovědná za většinu rozdílů v délce řetězce tRNA (Zamudio, 2018; Giegé, 1993). T smyčka, kterou struktura pokračuje, obsahuje ribothymidin a pseudouridin (McCloskey, 1977). Významnou roli při kontaktu tRNA s aminoacyl-tRNA syntetázami hraje akceptorové rameno. (Giege, 1998; Zamudio, 2018). Na 3' konci tohoto ramene je úsek tří nukleotidů CCA. Na -OH skupinu posledního nukleotidu je během aminoacylace navázána aminokyselina (Ibba, 2000; Perona, 2002). Struktura je zobrazena na Obrázku 5.

Výše popisovaná sekundární struktura je v prostoru složená do trojrozměrného tvaru. V trojrozměrném prostoru je možné popsat tvar molekuly její terciární strukturou, jež nabývá

podoby velkého tiskacího písmene L. Na jednom konci obsahuje akceptorové rameno a na druhém konci písmene L anti-kodónovou smyčku (Ahn, 2003).



Obrázek 5: Sekundární (nalevo) a terciární (vpravo) struktura tRNA. Na obrázku sekundární struktury je od 5' konce je zobrazena D smyčka s dvěma dihydrouridiny (D), anti-kodónová smyčka s inosinem (I), variabilní smyčka, a T smyčka s ribothymidinem (T) a pseudouridinem (Ψ). Na 3' konci je pak CCA úsek, na který se váže aminokyselina. Na obrázku terciární struktury je vidět složení struktury do tvaru písmene L, a kde se v této struktuře nachází jednotlivé smyčky a 3' konec s akceptorovým ramenem. Obrázek sekundární struktury převzat z *The Online Macromolecular Museum*:

https://earth.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/jsmolnew/trna/trna.html
 Obrázek terciární struktury převzat z (Ouellette, 2018).

4.4. Aminoacyl-tRNA syntetázy

Aminoacyl-tRNA syntetázy jsou enzymy, které jsou, spolu s tRNA, článkem propojujícím RNA a proteiny v toku informací od DNA k funkčním proteinům. Toho je dosaženo velkou specificitou AARS ke konkrétní aminokyselině a k její příslušné tRNA. Aminoacylace je proces složený ze dvou kroků. Nejdříve je aminokyselina navázána namísto pyrofosfátu na adenosin monofosfát, a následně je přenesena na vlastní tRNA. Tento proces nebo-li aminoacylace tRNA, je blíže popsán v kapitole 3.1. Podle struktury se AARS se dělí do dvou tříd. Přestože se funkce a výsledek syntetáz obou tříd neliší, mechanismy jejich fungování jsou zřetelně odlišné (Cusack, 1990). Enzymy Třídy I fungují jako monomery, zatímco enzymy Třídy II tvoří převážně dimery a tetramery (Burbaum, 1991). Dalším rozdílem je skutečnost, že Třída I váže aminokyselinu na 2'-OH skupinu terminálního adenosinu cílové tRNA, zatímco

Třída II na 3'-OH skupinu konečného adenosinu cílové tRNA. Nakonec se však i aminokyselina navázaná pomocí enzymů Třídy I transesterifikací přesune na 3'-OH pozici. Výjimku z tohoto pravidla tvoří PheRS patřící do Třídy II, která také navazuje aminokyselinu nejdříve na 3'-OH skupinu tRNA (Rubio Gomez, 2020).

4.4.1. Třída I aminoacyl tRNA syntetáz

Katalytická doména AARS Třídy I obsahuje tzv. *Rossmannův fold*, motiv vázající nukleové kyseliny, složený ze střídajících se α -helixů a β -skládaných listů (Burbaum, 1991). K rozpoznávání příslušných aminokyselin jim slouží vazebné místo mající charakter kapsy, do které se uloží pouze aminokyselina příslušných vlastností. Konkrétní použité strategie jsou, podle aminokyseliny, například selekce podle velikosti, náboje, či využití iontů kovu, které se váží na specifické chemické skupiny aminokyselin AARS (Rubio Gomez, 2020). Při kontaktu AARS Třídy I s tRNA interaguje v důsledku maximalizace plochy dotyku s enzymem až pětina povrchu molekuly tRNA. Během kontaktu AARS s tRNA dochází ke změnám v konformacích obou molekul a k navázání AARS na tRNA. Při navázání tRNA mění protein konformaci a AARS rozpoznává malý žlábek akceptorového helixu tRNA. V kontaktu s rozpouštědlem je, v důsledku rozpoznávání ze strany malého žlábků, které provádí α -helix, variabilní smyčka tRNA (Ruff, 1991).

Enzymy Třídy I (například MetRS, TyrRS, GlnRS, kde název aminoacyl-tRNA syntetáz je tvořen podle klíče XxxRS, kde Xxx je zkratka aminokyseliny, kterou AARS rozpoznává) fungují nejčastěji jako monomery, výjimečně pak jako dimery. Díky svému aktivnímu místu, které má tvar otevřené kapsy, nejčastěji aktivují objemnější aminokyseliny (Rajendran, 2018). Dělí se na několik dalších tříd, různí autoři uvádí členění buďto na tři nebo pět podskupin (Rubio Gomez, 2020), přičemž členění sleduje společné vlastnosti aminokyselin rozeznávaných AARS. AARS Podtřídy Ia rozeznává alifatické aminokyseliny Leu, Ile, Val a aminokyseliny obsahující atom síry Met a Cys. AARS Podtřídy Ib jsou v této třídě zodpovědné za aktivování polárních aminokyselin Lys, Glu a Gln. Na AARS z Podtřídy Ic připadají aromatické aminokyseliny Tyr a Trp. Při rozdělení na pět podskupin je možné také sledovat chemickou podobnost substrátových aminokyselin v rámci jednotlivých podtříd: Podtřída Ia obsahuje hydrofobní aminokyseliny a alifatickými skupinami; AARS z Podtřídy Ib aktivuje aminokyseliny, které jsou nabité, AARS z Podtřídy Ic aktivují aminokyseliny s aromatickými zbytky, AARS Podtřídy Id obsahuje pouze jeden enzym aktivující Arg, který je strukturně odlišný od enzymů z ostatních skupin. Do Podtřídy Ie se zařazuje jeden ze dvou

enzymů aktivující lysin ze Třídy I pro své unikátní strukturní prvky, které jej odlišují od enzymů Podtřídy Ib, kam by jinak spadal (Rajendran, 2018). Úplné členění AARS podle varianty s pěti podtřídami je uvedené v Tabulce 1.

4.4.2. Třída II aminoacyl tRNA syntetáz

Všechny enzymy ze Třídy II mají společné tři motivy, Motiv 1-3 opakující se ve všech monomerech a jejich aktivní místo je tvořené antiparalelními β -skládanými listy obalenými α -helixy (Cusack, 1990). Motiv 1 je představován dlouhým α -helixem napojeným na část β -skládaného listu, díky které dochází k dimerizaci proteinu. Motiv 2 je tvořen dvěma antiparalelními vlákny z β -skládaného listu spojenými vlásenkou, tedy volně vlajícím dlouhým vláknem. Motiv 3 tvoří β -vlákno a za ním jdoucí α -helix (Delarue, 1993). Rozpoznávání tRNA probíhá u Třídy II přes velký žlábek. Stejně jako u Třídy I, i zde se konkrétnější podoba strategie pro rozpoznání aminokyseliny liší podle samotné aminokyseliny (Rubio Gomez, 2020).

Enzymy Třídy II tvoří převážně dimery a tetramery. Podtřídy Třídy II jsou opět utvořeny podle vlastností aminokyselin jimi aktivovaných, podobně jak bylo zmíněno výše. Podle přítomnosti C-terminální domény AARS účastníci se identifikace anti-kodónové kličky tRNA můžeme mezi enzymy Třídy II specifikovat AARS Podtříd Ia, Ib a Ic. Na rozdíl od enzymů patřící do Třídy I nejsou jejich sekvence tak přísně konzervované (Rubio Gomez, 2020). Podtřída Ia je složena z enzymů aktivujících glycin (Gly), histidin (His), prolin (Pro), serin (Ser) a threonin (Thr). AARS z Podtřídy Ib aktivují lysin (Lys), kyselinu aspargovou (Asp) a asparagin (Asn), tedy polární AK (Rubio Gomez, 2020). Podtřída Ic sestává z enzymů rozpoznávajících Ala, Phe, Gly a Pyl. U Třídy II je jedním z rozdílů mezi podskupinami i to, že AARS z Podtříd Ia a Ib fungují převážně jako dimery, zatímco enzymy z Podtřídy Ic jsou hlavně tetramery (Rajendran, 2018).

| Třída | Podtřída | AARS | Organismus | PDB ID |
|-------|----------|-----------------------------|---------------------------------|--------|
| I | a | Isoleucyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1ILE |
| | | Methionyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1A8H |
| | | Leucyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1H3N |
| | | Valyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1GAX |
| | b | Cysteinyl tRNA syntetáza | <i>Escherichia coli</i> | 1LI5 |
| | | Glutamyl tRNA syntetáza | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 4H3S |
| | | Glutamyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1J09 |
| | c | Tyrosyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1H3F |
| | | Tryptophanyl tRNA syntetáza | <i>Homo sapiens</i> | 2AKE |
| | d | Arginyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1IQ0 |
| | e | Lysyl tRNA syntetáza | <i>Pyrococcus horikoshii</i> | 1IRX |
| II | a | Glycyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1ATI |
| | | Histidyl tRNA syntetáza | <i>Escherichia coli</i> | 1HTT |
| | | Prolyl tRNA syntetáza | <i>Plasmodium falciparum</i> | 4TWA |
| | | Serinyl tRNA syntetáza | <i>Methanosarcina barkeri</i> | 2CJB |
| | | Threonyl tRNA syntetáza | <i>Escherichia coli</i> | 1QF6 |
| | b | Asparaginyl tRNA syntetáza | <i>Brugia malayi</i> | 2XGT |
| | | Aspartyl tRNA syntetáza | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1ASY |
| | | Lysyl tRNA syntetáza | <i>Homo sapiens</i> | 4YCU |
| | c | Alanyl tRNA syntetáza | <i>Archaeoglobus fulgidus</i> | 3WQY |
| | | Glycyl tRNA syntetáza | <i>Homo sapiens</i> | 2ZT5 |
| | | Phenylalanyl tRNA syntetáza | <i>Thermus thermophilus</i> | 1B70 |
| | | Pyrolysyl tRNA syntetáza | <i>Methanosarcina mazei</i> | 2Q7H |

Tabulka 1 Rozdělení AARS do tříd podle struktury a interakce s ATP. Převzato z (Rajendran, 2018)

4.4.3. Ortogonalita aminoacyl-tRNA syntetáz v buňce

Jedna z nezbytných podmínek, které musí splňovat dvojice tRNA/aminoacyl-tRNA syntetáza použitá k rozšíření genetického kódu, je unikátnost, tj. aby použitá AARS rozeznávala pouze konkrétní tRNA, která není rozeznávána žádnou jinou AARS přítomnou v cílovém organismu. Této vlastnosti se říká ortogonalita a o tRNA/AARS párech se říká, že jsou v daném organismu ortogonální (Melnikov, 2019). Tyto tRNA/AARS páry jsou označovány jako ortogonální translační systémy (OTS).

AARS rozeznávají aminokyseliny a tRNA. Interakce s aminokyselinami bude rozebrána podrobněji níže v kapitole 4.4.4. Molekulu tRNA rozeznávají AARS pomocí takzvané „*identity*“, která je tvořena drobnými úseky struktury tRNA, zajišťujícími přesnou identifikaci. Tento systém znaků je také pojmenováván jako operativní kód a vyskytuje se po celé struktuře tRNA. Správné molekuly tRNA jsou AARS identifikované pomocí stereochemických znaků (Giege, 1998; Zamudio, 2018). Tyto znaky mohou působit jako

identifikační signál pro enzym aktivující danou tRNA (*identity element*), tak i pro zabránění aktivace špatnou aminokyselinou (*anti-identity element*) (Melnikov, 2019). Tuto podmínku často splňují enzymy a tRNA z organismů spadajících do jiné domény stromu života. Například pro bakterii je vhodné hledat OTS ve skupině archea (Vargas-Rodriguez, 2018).

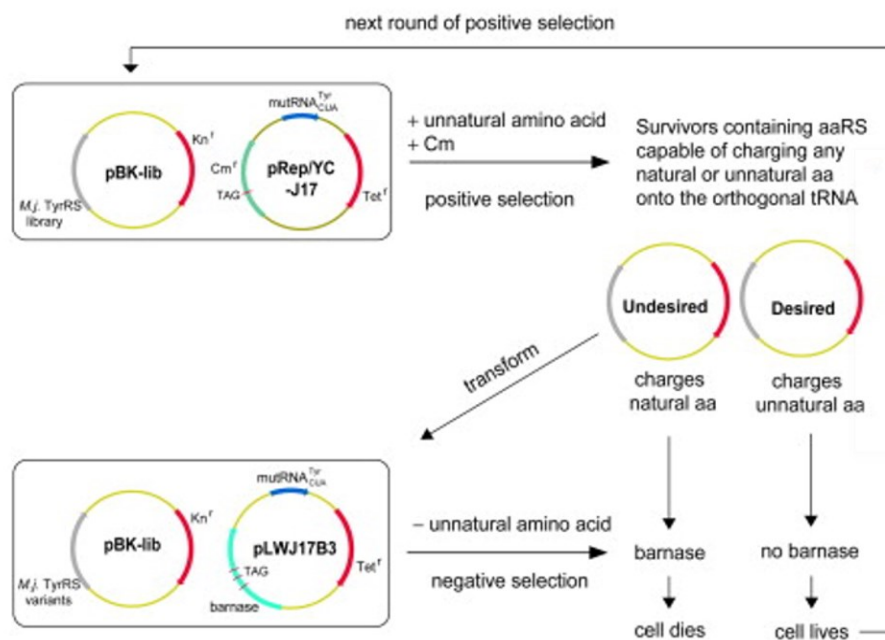
4.4.4. Specifita syntetáz k nekanonickým aminokyselinám

Aby rozpoznaly správnou aminokyselinu, a tím dosáhly své specifity, využívají AARS mnoha různých mechanismů. Důležité jsou při tom zejména nekovalentní interakce mezi AARS a aminokyselinou a struktura vazebného místa AARS (Rubio Gomez, 2020). Nekovalentní interakce podléhají přísným sterickým podmínkám a jsou vratné. Jejich energie se pohybuje v rozmezí od 10 do 80 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Od nejsilnějších po nejslabší se jedná o vodíkové můstky, π -patrové interakce, solné můstky a hydrofobní interakce. V případě aminokyselin, jejichž vedlejší řetězce jsou velmi strukturně podobné (např. valin, leucin, isoleucin) a slabé nekovalentní interakce nemohou vyloučit záměnu a nesprávnou aminoacylaci, využívají enzymy mechanismy dodatečné editace a sterické působení.

AARS z vhodně zvoleného ortogonálního páru tRNA/AARS můžeme upravit pro specifitu k aminokyselinám, které mohou například rozšířit chemické vlastnosti vznikajícího proteinu. K tomuto účelu upravené enzymy už byly připraveny pro více než 150 různých nekanonických aminokyselin (Tharp, 2020). Jedny z nejvíce používaných párů pro aktivaci tRNA nekanonickými aminokyselinami jsou (tyr)tRNA/TyrRS z organismu *Methanocaldococcus jannaschii* a (pyl)tRNA/PyIRS z *Methanosarciny*. TyrRS je ortogonální v bakteriích a je hojně používán v *E. coli*, ale není vhodný pro použití v eukaryotických organismech kvůli podobným *identity element*ům s eukaryotní (tyr)tRNA. Pro použití v eukaryotech byla například připravena TyrRS z *E. coli*. Pro vývoj aminoacyl-tRNA syntetáz specifických ke konkrétní nekanonické aminokyselině je dnes k dispozici celá řada metod. Tyto metody bohužel většinou vedou k velké redukci aktivity AARS a pomalejší aktivaci odpovídajících aminokyselin, a tedy i nižší rychlosti syntézy proteinů, obsahujících dané aminokyseliny.

Jedna z možností úpravy specifity AARS ke konkrétním nekanonickým aminokyselinám, je tzv. dvoukolovou selekcí (Xie, 2005). Při tomto přístupu je nejprve konstruována knihovna genu kódujícího AARS s náhodnými mutacemi v místě kapsy vázající aminokyselinu. Tato knihovna je poté podrobena střídavě pozitivní a negativní selekci, tak aby

byla zajištěna specifita k nekanonické aminokyselině, a zároveň byly vyřazeny varianty AARS schopné vázat aminokyseliny nespecifické. Během kol pozitivní selekce jsou buňky pěstovány v přítomnosti nekanonické aminokyseliny a chloramphenicolu, vůči kterému jsou buňky rezistentní, pokud jsou schopné translatovat chloramphenicol acetyl transferázu (CAT). Pro test schopnosti AARS nabíjet tRNA aminokyselinou je do genu pro CAT vnesen *amber* stop kodón, buňka tedy musí být schopná potlačit tuto mutaci pomocí tRNA^{CUA}. Negativní selekce je pak nutná pro ty AARS, které sice tRNA^{CUA} nabily, ale nabily je nesprávnou aminokyselinou. Negativní selekce je prováděna pomocí mutovaného genu kódujícího barnázu. Úspěšná translace barnázy je pro buňku toxická až letální. Negativní selekce probíhá v médiu bez přítomnosti cílové nekanonické aminokyseliny. Pokud je během translace genu barnázy potlačený *amber* stop kodón, protože AARS nabila tRNA^{CUA} aminokyselinou přítomnou v buňce, je kmen nesoucí tuto AARS vyřazen z další selekce. Opakování pozitivních a negativních kol selekce vede k výběru AARS, které jsou specifické k žádané nekanonické aminokyselině a nerozeznávají substráty nacházející se v buňce (Xie, 2005). Tento proces je ilustrován v obrázku 6.



Obrázek 6: schéma dvoukrokové selekce AARS pomocí pozitivní a negativní selekce s využitím mutovaných genů pro CAT a barnázy. Úspěšný proces aminoacylace tRNA je kontrolována translací CAT, zatímco nežádoucí aminoacylace jinou, než cílovou nekanonickou aminokyselinou je kontrolována genem pro barnázu s vloženým *amber* stop kodónem. Převzato z (Xie, 2005).

Jedna z dalších metod, jak zvýšit efektivitu upravených AARS je PACE (z anglického *Phage Assisted Continuous Evolution*) (Bryson, 2017).

5. Závěr

Pro úspěšnou syntézu proteinů s nekanonickými aminokyselinami je nutné vyřešit několik problémů. Kódování nekanonických aminokyselin v genetickém kódu, přípravu AARS specifických k patřičným aminokyselinám a přípravu samotných nekanonických aminokyselin. Zároveň je žádoucí optimalizovat řešení těchto problémů tak, aby byla proteosyntéza s nekanonickými aminokyselinami co nejefektivnější a kvalitativně co nejblíže kanonické translaci.

Práce přiblížila několik metod přípravy nových kodónů pro kódování nekanonických aminokyselin z publikované literatury. Především metodu rozšíření genetické abecedy o hydrofobní nukleotidy NaM a TPT3, metodu umlčování *amber* stop kodónu a s ní související modifikované organismy s *amber* stop kodónem nahrazeným v genomu *ochre* stop kodónem, což umožňuje výrazně zefektivnit dekódování *amber* stop kodónu jako nekanonické aminokyseliny, a metodu využití quadrupletových kodónů poskytujících více volných kodónů pro kódování aminokyselin. V práci je také zpracována metoda vyvinutého ortogonálního ribosomu a ortogonální mRNA, která umožňuje optimalizovat tento ortogonální ribosom pro syntézu proteinů obsahujících nekanonické aminokyseliny bez narušení chodu hostitelské buňky. Pro přípravu AARS specifických k novým nekanonickým aminokyselinám byl představen obecně aplikovatelný postup dvoukolové selekce publikovaný v literatuře. Práce ukazuje některé příklady úspěšného využití nekanonických aminokyselin v proteinech. Zmiňuje využití v léčivech pro prodloužení životnosti proteinových léčiv, využití oximové vazby pro navázání účinné látky do polypeptidové micely a její cílené uvolnění v kyselém prostředí. Ukazuje, jakou roli mohou nekanonické aminokyseliny hrát při vývoji nových metaloproteinů. Dále pak popisuje demonstraci aplikace fluorescenčně aktivní nekanonické aminokyseliny jako prostředku pro značení proteinů. Dalším využitím je pak vnesení atomu jódu do proteinu na aminokyselině za účelem zkoumání struktury proteinu rentgenovým zářením.

Technologie začlenění nekanonických aminokyselin do proteinů *in vivo* během proteosyntézy za pomoci OTS nabízí mnoho užitečných aplikací a využití. Proteiny obsahující nekanonické aminokyseliny mohou fungovat jako sondy pro různé zobrazovací technologie, jako jsou rentgenové záření, sondy pro infračervené záření či fluorescenčně značené aminokyseliny. Při vývoji nových enzymů mohou být například využity ve vazebném místě, kde umožňují chelataci iontů kovu, například pro konstrukci metaloenzymů umožňujících

katalýzu širokého spektra enzymatických reakcí. Dále jsou také nekanonické aminokyseliny, resp. proteiny je obsahující, využitelné pro cílení léčiv místo jejich primárního účinku.

Dále by měla být upínána snaha k syntéze dalších nekanonických aminokyselin a hledání nových oblastí využití proteinů je obsahujících. Pokud se podaří technologii inkorporace nekanonických aminokyselin do proteinů ještě více zpřístupnit odborné veřejnosti a optimalizovat, dosáhnout rychlosti a přesnosti translace obdobné kanonické translaci, skýtá tato technologie velký potenciál pro biotechnologie a pro naše hlubší porozumění struktuře proteinů. Vyvinutí modelových organismů a protokolů pro snadnou inkorporaci nekanonických aminokyselin do proteinů by ještě více urychlilo a usnadnilo další pokrok a umožnilo objevit širší spektrum využití této technologie v dalších oblastech biologie či biotechnologie.

Použitá literatura

* označené sekundární citace

AHN, H. J., 2003. Crystal structure of tRNA(m1G37)methyltransferase: insights into tRNA recognition. *The EMBO Journal* [online]. **22**(11), 2593-2603 [cit. 2021-05-27]. ISSN 14602075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdg269

ANDERSON, J., N. WU, S. SANTORO, V. LAKSHMAN, D. KING a P. SCHULTZ, 2004. An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **101**(20), 7566-7571 [cit. 2021-05-14]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0401517101

*ATKINS, J. F., R. B. WEISS, S. THOMPSON a R. F. GESTELAND, 1991. Towards a Genetic Dissection of the Basis of Triplet Decoding, and Its Natural Subversion: Programmed Reading Frame Shifts and Hops. *Annual Review of Genetics* [online]. **25**(1), 201-228 [cit. 2021-07-01]. ISSN 0066-4197. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.ge.25.120191.001221

BACHER, J. a P. SCHIMMEL, 2007. An editing-defective aminoacyl-tRNA synthetase is mutagenic in aging bacteria via the SOS response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **104**(6), 1907-1912 [cit. 2021-05-31]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0610835104

BANIK, Sindrila Dutta a Nilashis NANDI, 2012. Mechanism of the activation step of the aminoacylation reaction: a significant difference between class I and class II synthetases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online]. **30**(6), 701-715 [cit. 2021-07-13]. ISSN 0739-1102. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2012.689701

BRYSON, David, Chenguang FAN, Li-Tao GUO, Corwin MILLER, Dieter SÖLL a David LIU, 2017. Continuous directed evolution of aminoacyl-tRNA synthetases. *Nature Chemical Biology* [online]. **13**(12), 1253-1260 [cit. 2021-05-31]. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.2474

*BURBAUM, J.J. a P. SCHIMMEL, 1991. Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **266**(26), 16965-16968 [cit. 2021-05-27]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)47323-7

BYUN, Byung Jin a Young Kee KANG, 2011. Conformational preferences and pKa value of selenocysteine residue. *Biopolymers* [online]. **95**(5), 345-353 [cit. 2021-08-10]. ISSN 00063525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.21581

COSTA, Simone A., Davoud MOZHDEHI, Michael J. DZURICKY, Farren J. ISAACS, Eric M. BRUSTAD a Ashutosh CHILKOTI, 2018. Active Targeting of Cancer Cells by Nanobody Decorated Polypeptide Micelle with Bio-orthogonally Conjugated Drug. *Nano Letters* [online]. **19**(1), 247-254 [cit. 2021-08-06]. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/acs.nanolett.8b03837

CUSACK, Stephen, Carmen BERTHET-COLOMINAS, Michael HÄRTLEIN, Nicolas NASSAR a Reuben LEBERMAN, 1990. A second class of synthetase structure revealed by X-

ray analysis of Escherichia coli seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* [online]. **347**(6290), 249-255 [cit. 2021-05-27]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/347249a0

DALLUGE, J., 1996. Conformational flexibility in RNA: the role of dihydrouridine. *Nucleic Acids Research* [online]. **24**(6), 1073-1079 [cit. 2021-05-27]. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/24.6.1073

*DELARUE, M. a D. MORAS, 1993. The aminoacyl-tRNA synthetase family: Modules at work. *BioEssays* [online]. **15**(10), 675-687 [cit. 2021-05-28]. ISSN 0265-9247. Dostupné z: doi:10.1002/bies.950151007

DRIENOVSKÁ, Ivana, Ana RIOZ-MARTÍNEZ, Apparao DRAKSHARAPU a Gerard ROELFES, 2015. Novel artificial metalloenzymes by in vivo incorporation of metal-binding unnatural amino acids. *Chemical Science* [online]. **6**(1), 770-776 [cit. 2021-08-03]. ISSN 2041-6520. Dostupné z: doi:10.1039/C4SC01525H

DUNKELMANN, Daniel L., Julian C. W. WILLIS, Adam T. BEATTIE a Jason W. CHIN, 2020. Engineered triply orthogonal pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA pairs enable the genetic encoding of three distinct non-canonical amino acids. *Nature Chemistry* [online]. **12**(6), 535-544 [cit. 2021-06-28]. ISSN 1755-4330. Dostupné z: doi:10.1038/s41557-020-0472-x

FISCHER, Emil, Koji HASHIMOTO, Yorke ZHANG et al., 2020. New codons for efficient production of unnatural proteins in a semisynthetic organism. *Nature Chemical Biology* [online]. **16**(5), 570-576 [cit. 2021-05-14]. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/s41589-020-0507-z

FRANCKLYN, Christopher S., 2008. DNA Polymerases and Aminoacyl-tRNA Synthetases: Shared Mechanisms for Ensuring the Fidelity of Gene Expression †. *Biochemistry* [online]. **47**(45), 11695-11703 [cit. 2021-05-31]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi801500z

*GIEGE, R., M. SISSLER a C. FLORENTZ, 1998. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Research* [online]. **26**(22), 5017-5035 [cit. 2021-05-27]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/26.22.5017

*GIEGÉ, Richard, Joseph PUGLISI a Catherine FLORENTZ, 1993. tRNA Structure and Aminoacylation Efficiency. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* [online]. San Diego: Elsevier, s. 129-206 [cit. 2021-05-26]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. ISBN 9780125400459. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6603(08)60869-7

HETTINGER, Thomas P., 2017. Helix instability and self-pairing prevent unnatural base pairs from expanding the genetic alphabet. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **114**(32), 6476-6477 [cit. 2021-05-14]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1703423114

HOHSAKA, Takahiro, Yuki ASHIZUKA, Hiroshi MURAKAMI a Masahiko SISIDO, 1996. Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Streptavidin through In Vitro Frame-Shift Suppression. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **118**(40), 9778-9779 [cit. 2021-07-13]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja9614225

CHEN, Yan, Yanmin WAN, Nanxi WANG, Zhe YUAN, Wei NIU, Qingsheng LI a Jiantao GUO, 2018. Controlling the Replication of a Genomically Recoded HIV-1 with a Functional Quadruplet Codon in Mammalian Cells. *ACS Synthetic Biology* [online]. **7**(6), 1612-1617 [cit. 2021-07-13]. ISSN 2161-5063. Dostupné z: doi:10.1021/acssynbio.8b00096

CHIN, Jason W., Stephen W. SANTORO, Andrew B. MARTIN, David S. KING, Lei WANG a Peter G. SCHULTZ, 2002. Addition of p -Azido- l -phenylalanine to the Genetic Code of *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **124**(31), 9026-9027 [cit. 2021-08-05]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja027007w

CHO, H., T. DANIEL, Y. J. BUECHLER et al., 2011. Optimized clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **108**(22), 9060-9065 [cit. 2021-08-11]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1100387108

*IBBA, Michael a Dieter SÖLL, 2000. Aminoacyl-tRNA Synthesis. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **69**(1), 617-650 [cit. 2021-05-27]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.617

*KIMOTO, Michiko a Ichiro HIRAO, 2020. Genetic alphabet expansion technology by creating unnatural base pairs. *Chemical Society Reviews* [online]. **49**(21), 7602-7626 [cit. 2021-05-31]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/D0CS00457J

LEDBETTER, Michael, Rebekah KARADEEMA a Floyd ROMESBERG, 2018. Reprogramming the Replisome of a Semisynthetic Organism for the Expansion of the Genetic Alphabet. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **140**(2), 758-765 [cit. 2021-05-14]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.7b11488

LEE, Jeong, Kirk BEEBE, Leslie NANGLE et al., 2006. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* [online]. **443**(7107), 50-55 [cit. 2021-05-30]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature05096

*LEE, Kyung Hyun, Kiyofumi HAMASHIMA, Michiko KIMOTO a Ichiro HIRAO, 2018. Genetic alphabet expansion biotechnology by creating unnatural base pairs. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **51**, 8-15 [cit. 2021-07-13]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2017.09.006

LIM, Sung In, Young S. HAHN a Inchan KWON, 2015. Site-specific albumination of a therapeutic protein with multi-subunit to prolong activity in vivo. *Journal of Controlled Release* [online]. **207**, 93-100 [cit. 2021-08-11]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.004

*LING, Jiqiang, Noah REYNOLDS a Michael IBBA, 2009. Aminoacyl-tRNA Synthesis and Translational Quality Control. *Annual Review of Microbiology* [online]. **63**(1), 61-78 [cit. 2021-05-31]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.091208.073210

MAGLIERY, Thomas J, J.Christopher ANDERSON a Peter G SCHULTZ, 2001. Expanding the genetic code: selection of efficient suppressors of four-base codons and identification of “shifty” four-base codons with a library approach in *Escherichia coli* Edited by M.

Gottesman. *Journal of Molecular Biology* [online]. **307**(3), 755-769 [cit. 2021-07-13]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.2001.4518

*MANANDHAR, Miglena, Eugene CHUN a Floyd ROMESBERG, 2021. Genetic Code Expansion: Inception, Development, Commercialization. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **143**(13), 4859-4878 [cit. 2021-05-14]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.0c11938

MCCLOSKEY, James a Susumu NISHIMURA, 1977. Modified nucleosides in transfer RNA. *Accounts of Chemical Research* [online]. **10**(11), 403-410 [cit. 2021-05-27]. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar50119a004

*MELNIKOV, Sergey a Dieter SÖLL, 2019. Aminoacyl-tRNA Synthetases and tRNAs for an Expanded Genetic Code: What Makes them Orthogonal?. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(8) [cit. 2021-05-30]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20081929

*NANGLE, Leslie, Valérie DE CRÉCY LAGARD, Volker DÖRING a Paul SCHIMMEL, 2002. Genetic Code Ambiguity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(48), 45729-45733 [cit. 2021-05-30]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M208093200

NEUMANN, Heinz, Kaihang WANG, Lloyd DAVIS, Maria GARCIA-ALAI a Jason W. CHIN, 2010. Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome. *Nature* [online]. **464**(7287), 441-444 [cit. 2021-07-13]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature08817

NOLL, M., H. NOLL a J. B. LINGREL, 1972. Initiation Factor IF-3-Dependent Binding of Escherichia coli Ribosomes and N-Formylmethionine Transfer-RNA to Rabbit Globin Messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **69**(7), 1843-1847 [cit. 2021-08-10]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.69.7.1843

*OUELLETTE, Robert J. a J. David RAWN, 2018. Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids. *Organic Chemistry* [online]. Elsevier, s. 973-1000 [cit. 2021-08-11]. ISBN 9780128128381. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812838-1.50030-X

PERONA, John J., Mark A. ROULD a Thomas A. STEITZ, 2002. Structural basis for transfer RNA aminoacylation by Escherichia coli glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* [online]. **32**(34), 8758-8771 [cit. 2021-07-13]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00085a006

*RAJENDRAN, Vijayakumar, Parismita KALITA, Harish SHUKLA, Awanish KUMAR a Timir TRIPATHI, 2018. Aminoacyl-tRNA synthetases: Structure, function, and drug discovery. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **111**, 400-414 [cit. 2021-05-27]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.157

RIDDLE, Donald a John CARBON, 1973. Frameshift Suppression: a Nucleotide Addition in the Anticodon of a Glycine Transfer RNA. *Nature New Biology* [online]. **242**(121), 230-234 [cit. 2021-06-30]. ISSN 0090-0028. Dostupné z: doi:10.1038/newbio242230a0

*RUBIO GOMEZ, Miguel a Michael IBBA, 2020. Aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA* [online]. **26**(8), 910-936 [cit. 2021-05-27]. ISSN 1355-8382. Dostupné z: doi:10.1261/rna.071720.119

RUFF, M., S. KRISHNASWAMY, M. BOEGLIN et al., 1991. Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science* [online]. **252**(5013), 1682-1689 [cit. 2021-05-28]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.2047877

SRINIVASAN, G., 2002. Pyrrolysine Encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-Decoding Specialized tRNA. *Science* [online]. **296**(5572), 1459-1462 [cit. 2021-07-21]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1069588

THARP, Jeffery, Natalie KRAHN, Umesh VARSHNEY a Dieter SÖLL, 2020. Hijacking Translation Initiation for Synthetic Biology. *ChemBioChem* [online]. **21**(10), 1387-1396 [cit. 2021-05-31]. ISSN 1439-4227. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.202000017

*TINGGI, Ujang, 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine* [online]. **13**(2), 102-108 [cit. 2021-08-10]. ISSN 1342-078X. Dostupné z: doi:10.1007/s12199-007-0019-4

VARGAS-RODRIGUEZ, Oscar, Anastasia SEVOSTYANOVA, Dieter SÖLL a Ana CRNKOVIĆ, 2018. Upgrading aminoacyl-tRNA synthetases for genetic code expansion. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. **46**, 115-122 [cit. 2021-05-30]. ISSN 13675931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2018.07.014

WANG, Jiangyun, Jianming XIE a Peter G. SCHULTZ, 2006. A Genetically Encoded Fluorescent Amino Acid. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **128**(27), 8738-8739 [cit. 2021-07-30]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja062666k

WANG, Kaihang, Heinz NEUMANN, Sew Y PEAK-CHEW a Jason W CHIN, 2007. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nature Biotechnology* [online]. **25**(7), 770-777 [cit. 2021-07-13]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1314

WANG, L., A. BROCK, B. HERBERICH a P. G. SCHULTZ, 2001. Expanding the Genetic Code of Escherichia coli. *Science* [online]. **292**(5516), 498-500 [cit. 2021-08-12]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1060077

WANG, Nanxi, Xin SHANG, Ronald CERNY, Wei NIU a Jiantao GUO, 2016. Systematic Evolution and Study of UAGN Decoding tRNAs in a Genomically Recoded Bacteria. *Scientific Reports* [online]. **6**(1) [cit. 2021-07-13]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep21898

XIE, Jianming, Wenshe LIU a Peter G. SCHULTZ, 2007. A Genetically Encoded Bidentate, Metal-Binding Amino Acid. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. **46**(48), 9239-9242 [cit. 2021-08-03]. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200703397

XIE, Jianming a Peter G. SCHULTZ, 2005. An expanding genetic code. *Methods* [online]. **36**(3), 227-238 [cit. 2021-07-30]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2005.04.010

XIE, Jianming, Lei WANG, Ning WU, Ansgar BROCK, Glen SPRAGGON a Peter G SCHULTZ, 2004. The site-specific incorporation of p-iodo-L-phenylalanine into proteins for structure determination. *Nature Biotechnology* [online]. **22**(10), 1297-1301 [cit. 2021-08-05]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1013

YANG, Zunyi, Daniel HUTTER, Pinpin SHENG, A. Michael SISIMOUR a Steven A. BENNER, 2006. Artificially expanded genetic information system: a new base pair with an alternative hydrogen bonding pattern. *Nucleic Acids Research* [online]. **34**(21), 6095-6101 [cit. 2021-07-13]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl633

*ZAMUDIO, Gabriel a Marco JOSÉ, 2018. Identity Elements of tRNA as Derived from Information Analysis. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* [online]. **48**(1), 73-81 [cit. 2021-05-26]. ISSN 0169-6149. Dostupné z: doi:10.1007/s11084-017-9541-6

ZHANG, Yorke, Brian LAMB, Aaron FELDMAN, Anne ZHOU, Thomas LAVERGNE, Lingjun LI a Floyd ROMESBERG, 2017b. A semisynthetic organism engineered for the stable expansion of the genetic alphabet. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **114**(6), 1317-1322 [cit. 2021-05-14]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1616443114

ZHANG, Yorke, Jerod PTACIN, Emil FISCHER et al., 2017a. A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information. *Nature* [online]. **551**(7682), 644-647 [cit. 2021-05-13]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature24659