

5. óra

2019. március 3.

- Indukált mutáció
- Allosztérikus szabályozás
- Anyagcsere mérnökség



Mutáció

... az örökítő anyagban bekövetkezett ugrásszerű változás, ami átöröklődik az utódokra.

Belső okok: a másolórendszer tökéletlenségéből eredő hibák: kb. 1 hiba/millió másolt bázis

Külső okok: a környezet mutagén hatásai:

- kémiai anyagok reagálnak a DNS-sel és megváltoztatják azt
- fizikai okok: sugárzások (kozmosz sugárzás, UV sugárzás, közetek radioaktív sugárzása, Röntgen)
Ezek a nagy energiájú sugárzások kémiai reakciókat idéznek elő a DNS-en.



Mutáció: ➤ Mindig a DNS-t érinti! (➔ Maradandó változás.)

replikáció



másolás

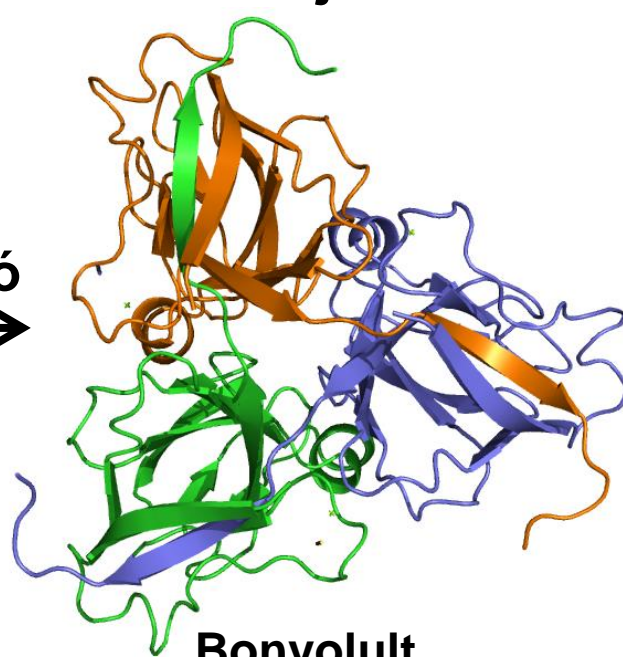
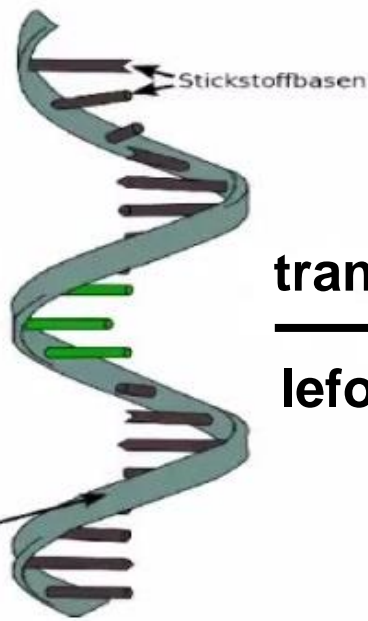
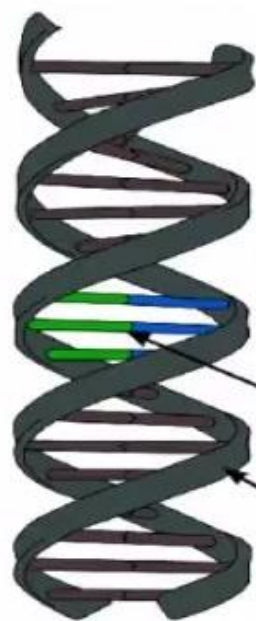
➤ Így viszont az RNS-ek és a fehérjék szerkezetére is kihat

➤ **STABILITÁS: DNS > RNS > fehérje**

DNS

RNS

fehérje



transzkripció

átírás

transzláció

lefordítás

Kettős szál

adenin, timin,

citozin, guanin ➔

nukleotidok

Egyes szál

adenin, *uracil*,

citozin, guanin ➔

nukleotidok

Bonyolult

térszerkezet

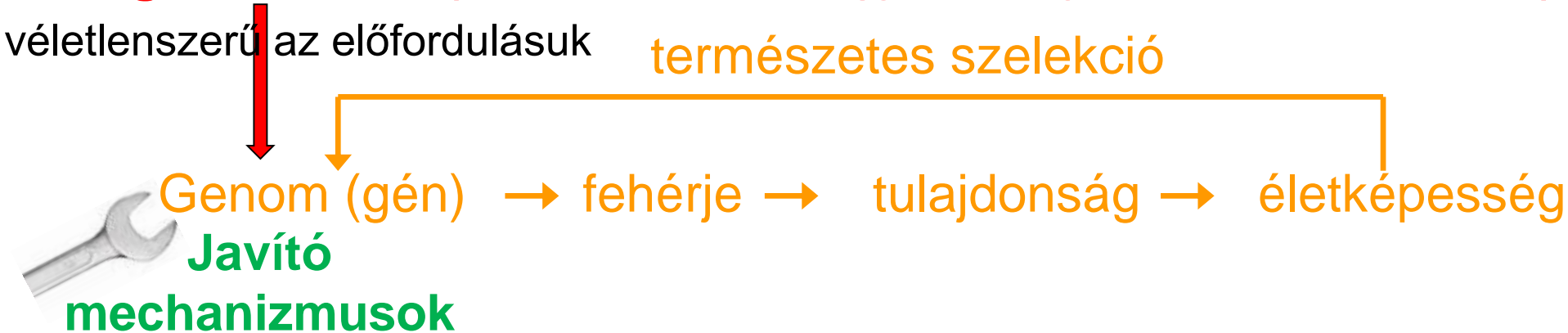
20-féle alfa

aminosav



A mutációk és a szelekció

Mutagén hatások (belső hatások vagy a környezetből származóak)



A természetes szelekció során dől el, hogy az adott egyed vagy populáció számára előnyös, hátrányos, esetleg „semleges”-e egy adott mutáció.

A mutagén hatások ellen a sejtben dolgoznak javító mechanizmusok, amelyek észlelik és javítják a mutációkat – egy bizonyos mértékig képesek erre – kialakítva ezzel egy egészséges mutációs rátát.

Egy mutáció lehet spontán (nincs ráhatásunk) vagy mesterséges (az ember által indukált).

Spontán mutáció → természetes szelekció

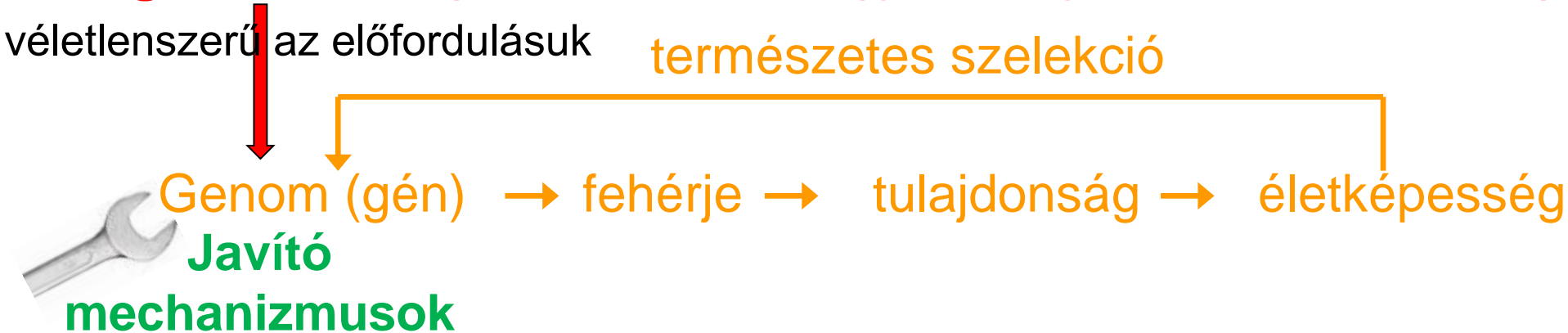
Indukált mutáció → mesterséges szelekció

~ növénynevelés, állattenyésztés



A mutációk és a szelekció

Mutagén hatások (belső hatások vagy a környezetből származóak)



- A mutációk kapcsolatban állnak a természetes szelekcióval, vagyis befolyásolhatják az adott egyed élet- és szaporodóképességét. Ez pozitív vagy negatív befolyásoló hatás is lehet.
- De mi is az a természets szelekció? → természetes kiválasztódás az adott egyed rátermettsége alapján.
- Spontán mutációkra példák: sarlósejtes vérszegénység, HIV rezisztencia, cisztás fibrózis, fenilketonuria. Marvel filmek mutánsai. 😊
- Mi is alkalmazhatunk mutációkat, hogy számunkra kedvező tulajdonságokat alakítsunk ki.
- De miért alkalmazunk mutációkat, ha pl. az állattenyésztés is lehetséges nélkülük? → Meg akarjuk gyorsítani a szelekciós folyamatot.
- Miért nem tudjuk akkor mutációk indukálásával meggyorsítani az állattenyésztést? → Mert nem tudjuk irányítani a hatását, kárt tehetünk az egyedben.
- A mikroba egyedekben nem teszünk kárt a mutációkkal? → De igen, viszont őket populációként kezeljük, az egyedeket nem kíméljük.

Génmanipulációs technikák

Az indukált mutáció és a mesterséges szelekció génmanipulációs technikák.

Génmanipuláció:

a gének megváltoztatása, vagy átvitele egyik organizmusból a másikba → ezáltal az élőlények tulajdonságainak megváltoztatása.

A változás öröklődik, megjelenik a következő generációkban is.

A génmanipuláció célja:

számunkra kedvező tulajdonságok létrehozása...

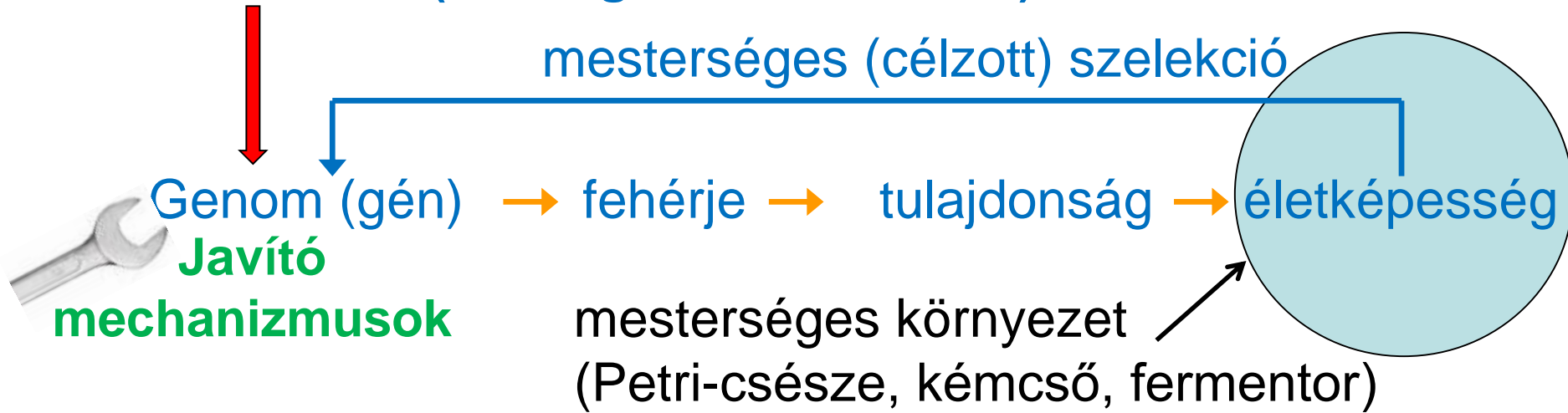
Vö. Ereky Károly vélekedésével, aki biotechnológia alatt azt a folyamatot értette, amelynek során **a nyersanyagok biológiai úton** (a növénytermesztés, az állatok takarmányozása és felhasználása révén) **a társadalom szempontjából hasznos termékekké alakíthatók.**

Ereky Károly a növényeket és az állatokat “biotechnológiai gépekhez” hasonlította.



III/1. Indukált mutáció

Indukált mutáció (mi magunk idézzük elő)



Ugyanaz, mint a spontán mutáció + természetes szelekció, csak itt **szabályozott körülmények között hajtjuk végre** → indukált mutáció + célzott szelekció.

A mutációs rátát és a szelekciót is mi állítjuk be.

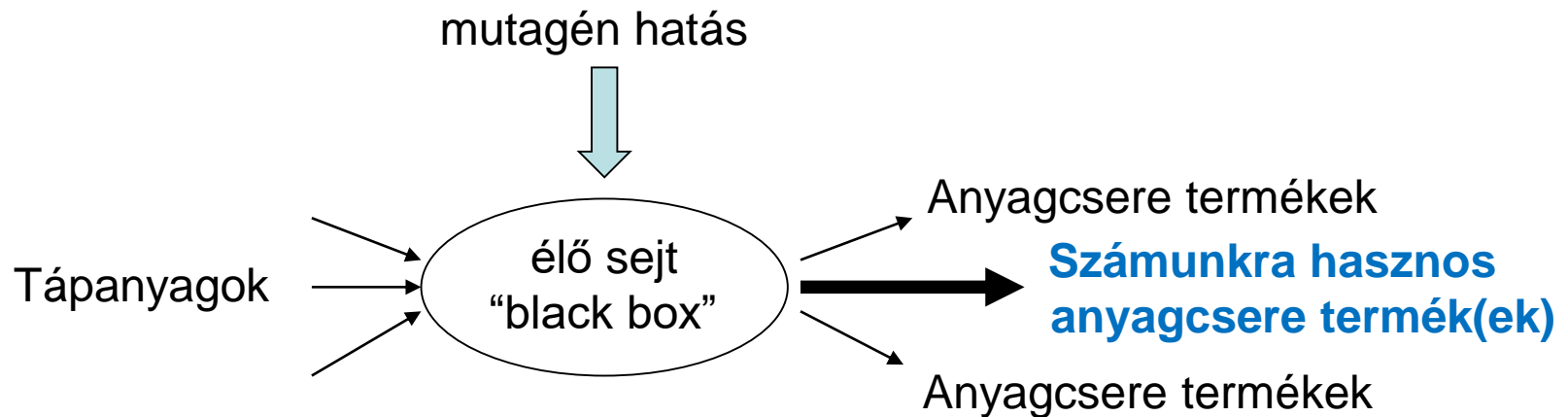
Célja: számunkra előnyös tulajdonságokkal rendelkező egyedeket – mikroba tenyészeteket – szeretnénk létrehozni.



Tudunk-e irányított, célzott génmanipulációt végezni? Lehetnek-e a mutációk célzottak, specifikusak?

Igen, de csak bizonyos megkötések mellett:

- Célzott génmódosításokhoz meg kell ismerni az adott mikroba genetikai állományát (DNS szekvenálás) és fel kell térképezni az anyagcsere útvonalait.
- Ha nem áll rendelkezésünkre mindez az információ, csak az indukált mutáció módszere marad.



Az indukált mutáció modellje: az élő sejtet "fekete dobozként" kezeljük, csak a tápanyag összetételre van közvetlen ráhatásunk és az anyagcsere termékeket tudjuk vizsgálni.

Kitekintés: az első teljes genom szekvenálást 1977-ben végezték el. Egy *E. coli* baktériumot fertőző vírus (bakteriofág) genomját határozták meg. DE: a penicillint már 1928-ban felfedezték, és 1942 óta gyártják.

III/1. Indukált mutáció

Mutációkat lehet előidézni:

- besugárzással (UV lámpa, Röntgen besugárzás)
- vegyszerekkel (salétromossav, N-mustár, mitomicin)

Körülmények:

- kezelési idő (expozíció)
- sejtkoncentráció
- tápoldat összetétele

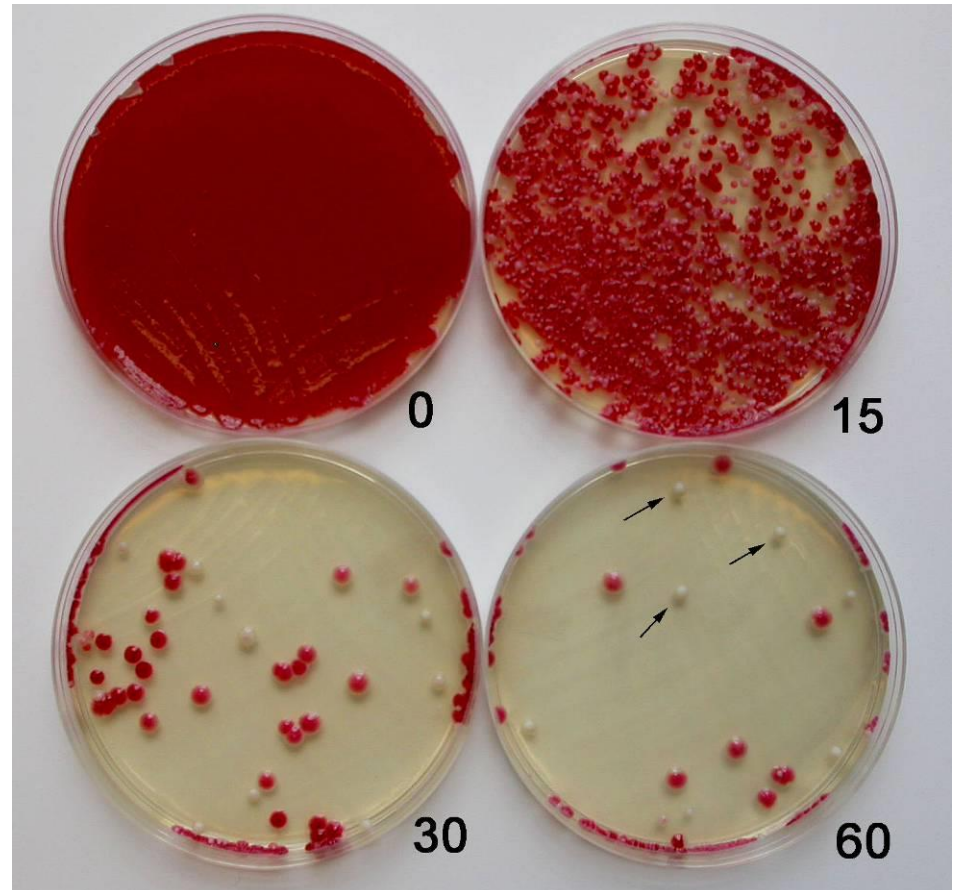


Besugárzás mutagén hatása

Exponenciális pusztulás, de a túlélők között feldúsul a mutánsok aránya.

A *Serratia marcescens* baktérium piros pigmentet termel. (Véres kenyér)

Az UV besugárzás során a sejtek egyre nagyobb hányada pusztul el. A túlélők között egyre több a mutáns egyed, amit a fehér telepek megjelenése mutat.



Indukált mutáció

Az indukált mutáció véletlenszerű folyamat, létrejöttének helyét nem tudjuk irányítani.

Ha egy bizonyos gén mutációja a célunk, akkor sok sejtet kell alávetni a mutációs kezelésnek. Ennek eredményeként sok és sokféle mutáns keletkezik, ezek közül kell kiválogatni azt a néhányat, amelynél éppen a megcélzott gén sérült.

Azaz nagyon sok mutáns törzset kell egyenként megvizsgálni, ami roppant munkaigényes. A táptalaj összetételének beállításával lehet szelektív növekedést elérni, de így is tenyészetek százait kell megvizsgálni.

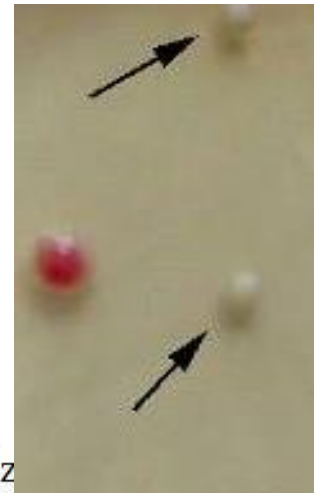
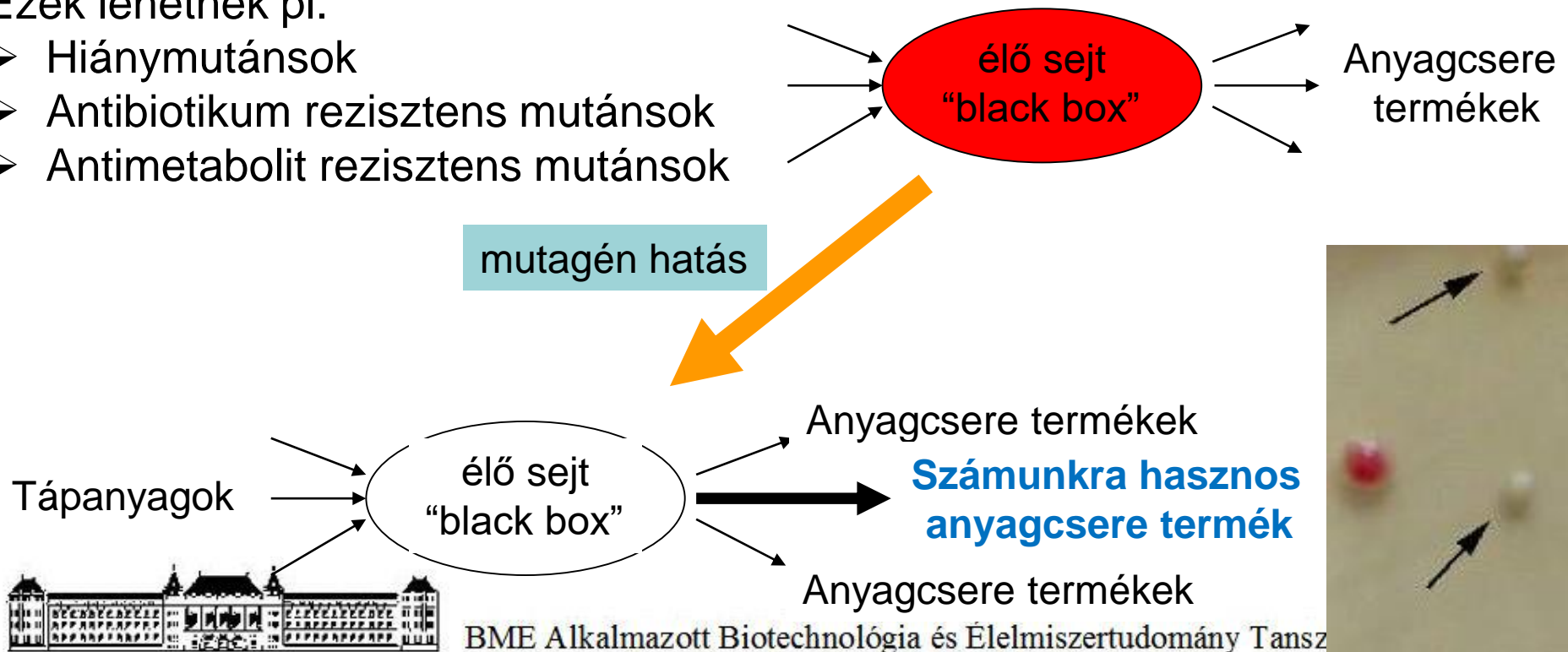


A számunkra kedvező mutációt szenvedett egyedek kiválogatása (szelektálása)

Egyszerűbb a számunkra előnyös mutációt tartalmazó mikrobákat azonosítani és szelektálni, ha azok járulékosan egy hiánymutációt vagy épp valamilyen anyaggal szembeni rezisztenciát, fokozott ellenállóképességet hordoznak.

Ezek lehetnek pl.

- Hiánymutánsok
- Antibiotikum rezisztens mutánsok
- Antimetabolit rezisztens mutánsok



Hiánymutánsok = auxotróf mutánsok

Olyan mutánsok, amelyek a mutáció következtében elvesztették egy számukra létfontosságú anyag (aminosav, nukleotid, vitamin) bioszintézisének képességét. Ezek csak akkor tudnak növekedni, ha ezt az anyagot készen kapják – ha belekeverjük a táptalajba.

Ezt a jelenséget kihasználhatjuk a hiánymutánsok azonosítására és elkülönítésére →

A hiánymutáns sokszor tartalmazhat egy másik, számunkra közvetlenül is hasznos mutációt.

Vagy épp a hiánymutáció áll kapcsolatban egy számunkra fontos anyagcsere termék túltermelésével (lásd az anyagcsere útvonalakat az óra végén).

Az ezt hordozó sejteket szeretnénk azonosítani és szelektálni a hiánymutáció segítségével.

Vad törzs (prototróf): minimál-táptalajon (szénhidrát, ásványi sók) is képes növekedni.

Hiánymutáns (auxotróf): a minimál táptalajon nem növekszik, csak akkor, ha azt kiegészítik az igényelt egy (vagy néhány) anyaggal.

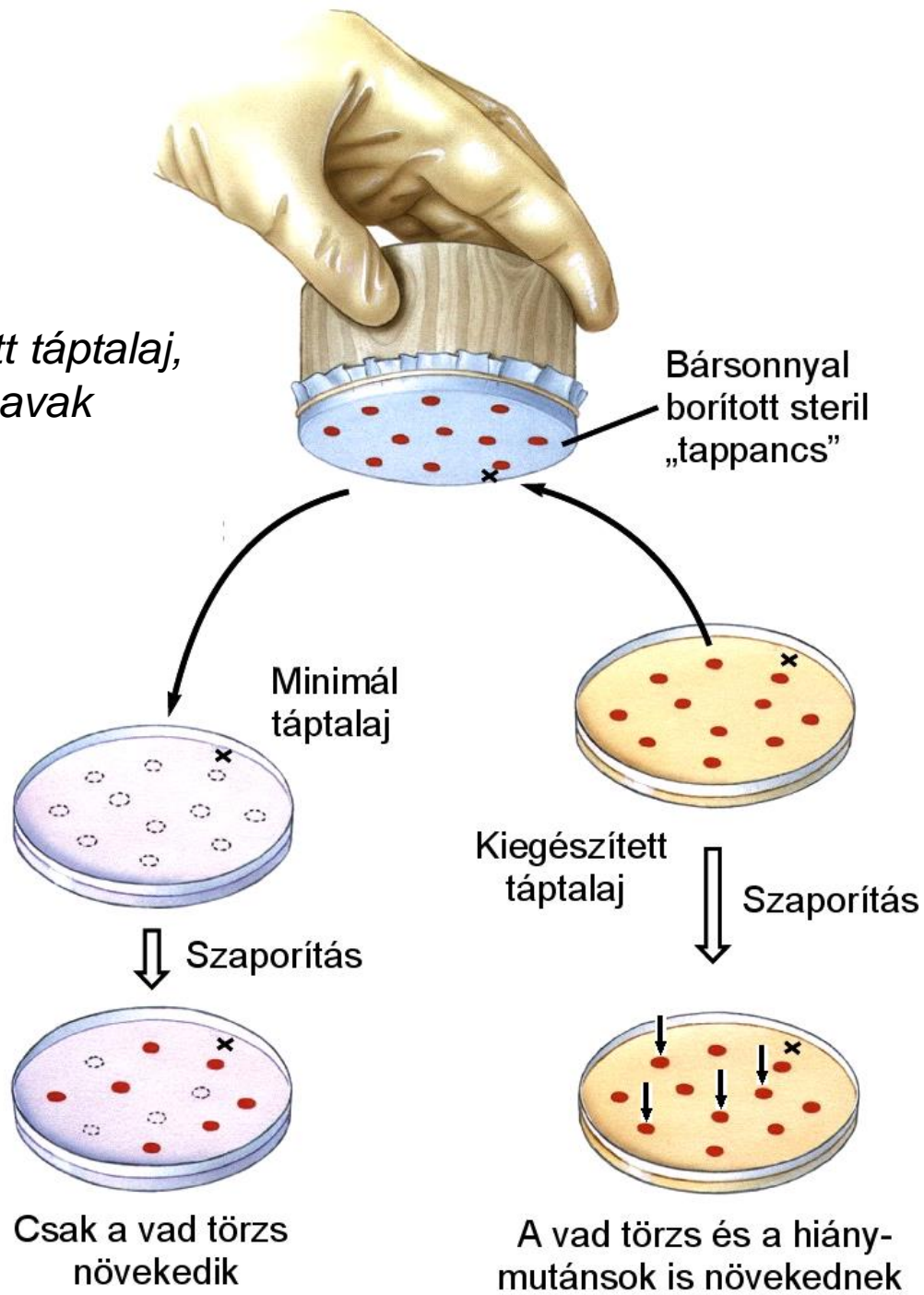


Hiánymutánsok izolálása

Fogalmak: minimál táptalaj, kiegészített táptalaj, eszenciális és nem eszenciális aminosavak

A túlélő mutáns sejteket kiegészített táptalajon telepekké szaporítjuk.

Ezeket egy „tappanccsal” átvisszük a minimál táptalajra is. Amelyik a minimál táptalajon „eltűnik” (nem tud növekedni) az a hiánymutáns.



Rezisztens (ellenálló) mutánsok

A vad törzstől abban térnek el, hogy valamely károsító, mérgező anyag jelenlétét sokkal nagyobb mértékben képesek elviselni.

Általában antibiotikum rezisztenciát értünk alatta, de lehet más anyag is.

A rezisztenciát szintén a számunkra hasznos mutációt hordozó sejtek azonosítására és szelektálására lehet felhasználni.

A gátló anyagot tartalmazó tápoldaton csak a rezisztens telepek nőnek ki, a vad törzs nem.

Az *antimetabolit rezisztencia* közvetlen jele lehet annak, hogy egy számunkra hasznos anyag termelését szabályozó (korlátozó) mechanizmusok a sejtben sérültek. → a sejtnek ez evolúciós hátrány (pazarlás a forrásokkal), de nekünk előnyös!



Antimetabolitok

metabolit = anyagcsere termék

antimetabolit = „hamis” anyagcsere termék

- Olyan vegyületek, amelyek szerkezetükben hasonlítanak egy „valódi” anyagcsere termékre, de a valóságban a sejt nem tudja felhasználni, továbbalakítani őket. (Vö.: olyan, mintha mi emberek a szomjunk oltására desztillált vizet vagy sós vizet innánk.)
- Emiatt fel tudják borítani a sejtben az anyagcsere szabályozását.
- A sejtben a hasonlóság révén egyes enzimeket „be tudnak csapni”. Emiatt a vad típusú sejtekre mérgező hatással vannak, csak egyes rezisztens mutánsok képesek túlélni az antimetabolitos kezelést.

Mit idéz elő egy antimetabolit és miért hasznos nekünk az antimetabolit rezisztencia?

Ennek jobb megértéséhez ismerjük meg az **allostérikus szabályozás** működését.



ALLOSZTÉRIKUS SZABÁLYOZÁS

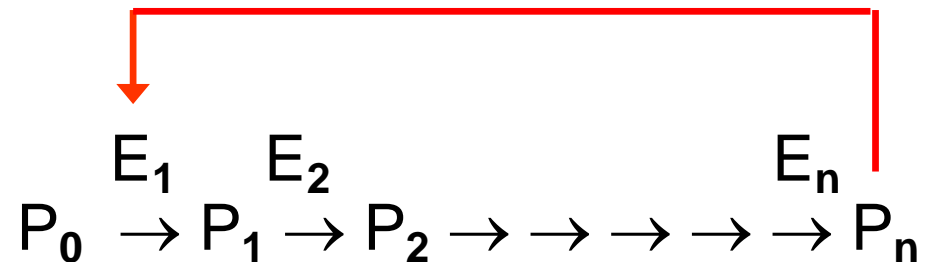
Célja a pazarlás, a fölösleges nyersanyag termelés megakadályozása.
Mindig egy enzim aktivitásának befolyásolását jelenti.

Vö: alkohol dehidrogenáz átírás és jegybanki alapkamat szabályozása

Allo-sztérikus ~ „másik helyű” szabályozás: az **enzimnek** van a **szubsztrát kötőhelyen** kívül egy **másik kötőhelye** is, ami az enzimaktivitás **szabályozására** szolgál. Mindig **a végtermék szabályozza** az adott reakciólánc vagy részfolyamat első enzimét, ez kötődik a másik helyre!

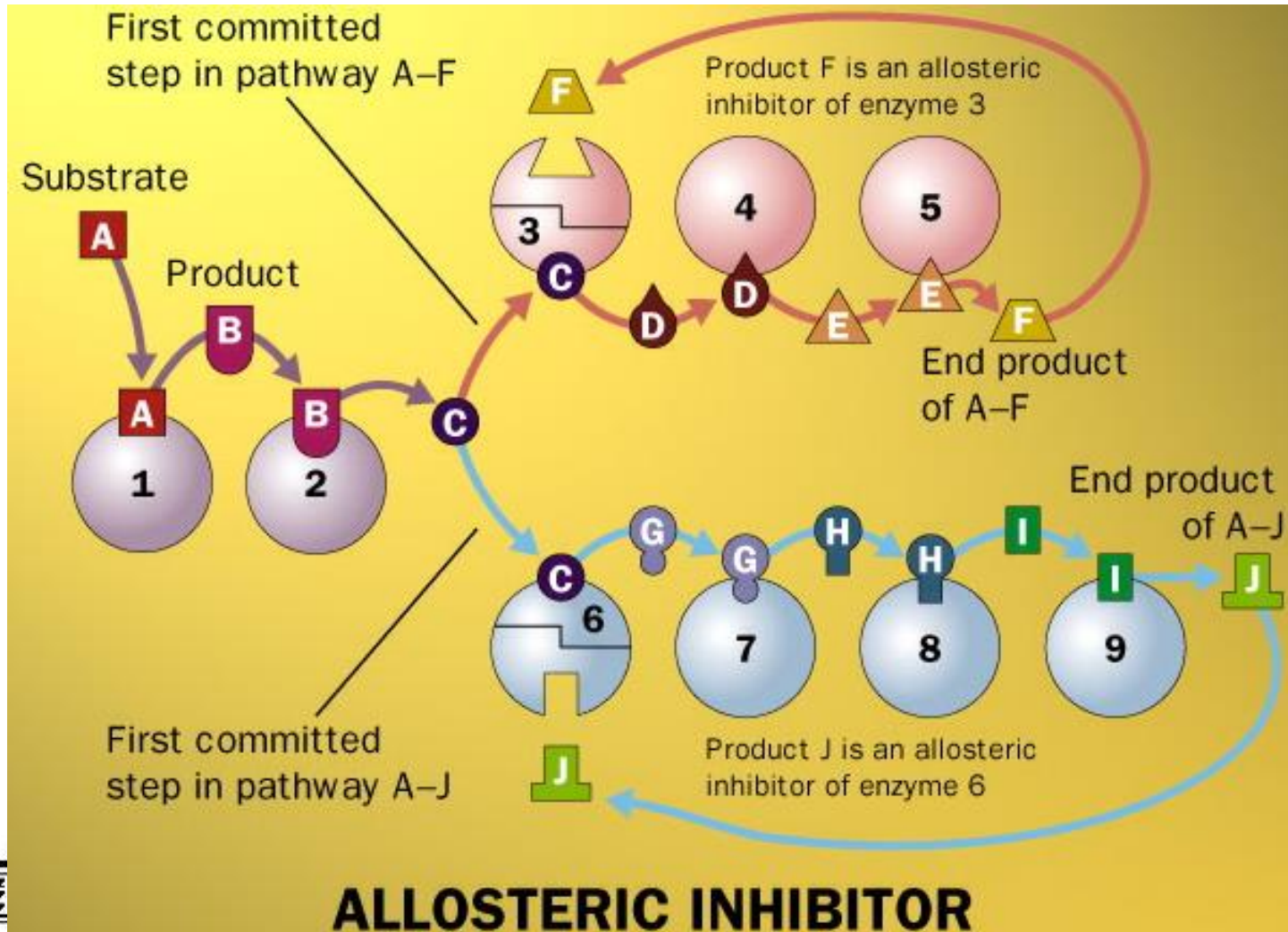
Végtermék-gátlás: egy reakciólánc végterméke visszahat és lefékezi saját termelődését, a legelső enzim működését. (Így a leginkább gazdaságos.)

A visszacsatolás alapvető eleme bármilyen szabályzásnak.



Elágazó reakcióláncok szabályozása

Allo-sztérikus ~ „másik helyű” szabályozás: az enzimnek van **a szubsztrát kötőhelyen kívül** egy **másik kötőhelye** is, ami **az enzimaktivitás szabályozására** szolgál. Mindig **a végtermék a szabályozó molekula**, ez **szabályozza** az adott reakciólánc vagy **részfolyamat első enzimét**. (Így a leginkább gazdaságos.)



Az allosztérikus szabályozás jellemzői

- Egyes enzim molekuláknak két, vagy több különböző aktivitású alakja lehetséges.
- Ezek reverzibilisen (megfordítható módon) átalakulhatnak egymásba.
- Az „átkapcsolást” egy (vagy több) szabályozó (modulátor) molekula kötődése hozza létre az enzim térbeli szerkezetének megváltoztatásán keresztül (harmadlagos, negyedleges szerkezet megváltoztatása).
- Hasonlít az operon szabályozáshoz, DE NEM AZONOS vele!
- Miben tér el egymástól a kettő?



Antimetabolit rezisztencia

Az antimetabolitok egy anyagcsere út végtermékéhez hasonlítanak. Szerkezeti hasonlóságuknál fogva szintén kapcsolódhatnak az anyagcsere út kezdeti lépését katalizáló enzimekhez, és allosztérikus inhibitoroként hatva le tudják fékezni a bioszintézist.

„Be tudják csapni”, ezeket a szabályozó mechanizmusokat, „elhitetik” a sejttel, hogy a kérdéses metabolit bőségesen rendelkezésre áll, termelését emiatt le kell állítani, pedig valójában hiányzik.

A vad törzs anyagcseréje leáll, a sejt elpusztul. Csak azok a rezisztens mutánsok élnek túl az antimetabolitos kezelést, amelyeknél ez a szabályozó mechanizmus sérült, és a túltermelést nem fékezi semmi.



A triptofán és antimetabolitja

Miben különbözik egy antimetabolit a valódi anyagcsere terméktől?

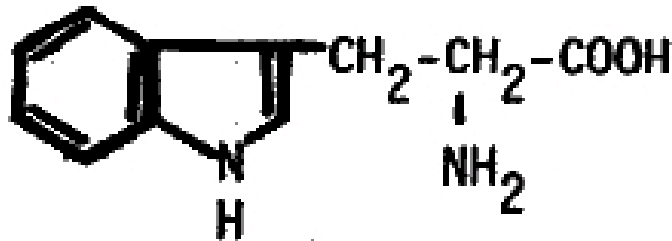
Antimetabolit: egy hamis anyagcsere termék. Képes szabályozásra, de nem alkalmas a további felhasználásra.

Triptofán – fehérjealkotó aminosav (és szabályozza saját termelését)

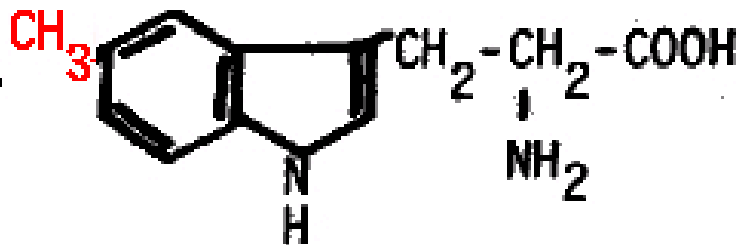
5-metil-triptofán – antimetabolit (nem tud fehérjébe beépülni, de „le”szabályozza a triptofán termelését)

Hogyan zavarja meg a triptofán termelést? → A termelés mértékének szabályozásába avatkozik be (az allosztérikus szabályozásba).

Tryptophan



5-methyltryptophan



Rezisztens (ellenálló) mutánsok

A vad törzstől abban térnek el, hogy valamely károsító, mérgező anyag jelenlétét sokkal nagyobb mértékben képesek elviselni.

Általában antibiotikum rezisztenciát értünk alatta, de lehet más anyag is. → **Lehet egy antimetabolit is!**

A rezisztenciát szintén a számunkra hasznos mutációt hordozó sejtek azonosítására és szelektálására lehet felhasználni.

A gátló anyagot tartalmazó tápoldaton csak a rezisztens telepek nőnek ki, a vad törzs nem.

Az antimetabolit is tekinthető antibiotikumnak, ami felborítja az anyagcsere termelés egy szabályozó mechanizmusát.

Az antimetabolitra rezisztens sejtek a túltermelés szabályozására (az adott termék allosztérikus szabályozására) rezisztensek.

Ezáltal számunkra hasznossá válnak.



Ipari termelés túltermelő mutánsokkal

Hogyan vehetünk rá egy mikróbát (mikróba populációt) arra, hogy egy számunkra szükséges anyagot a számára szükségesnél nagyobb mennyiségben termeljen?

A biotechnológiai iparnak egy fontos ágazatában a sejtekben egy amúgy kis koncentrációban jelen lévő anyagot a természetesnél sokkal nagyobb mennyiségben termeltetnek. Ehhez a sejtek genetikai állományát mutációkkal több ponton is át kell alakítani – így jutnak túltermelő mutánsokhoz.

Ezt a technikát nevezik **ANYAGCSERE MÉRNÖKSÉG**-nek (metabolic engineering) →



Anyagcsere mérnökség – metabolic engineering

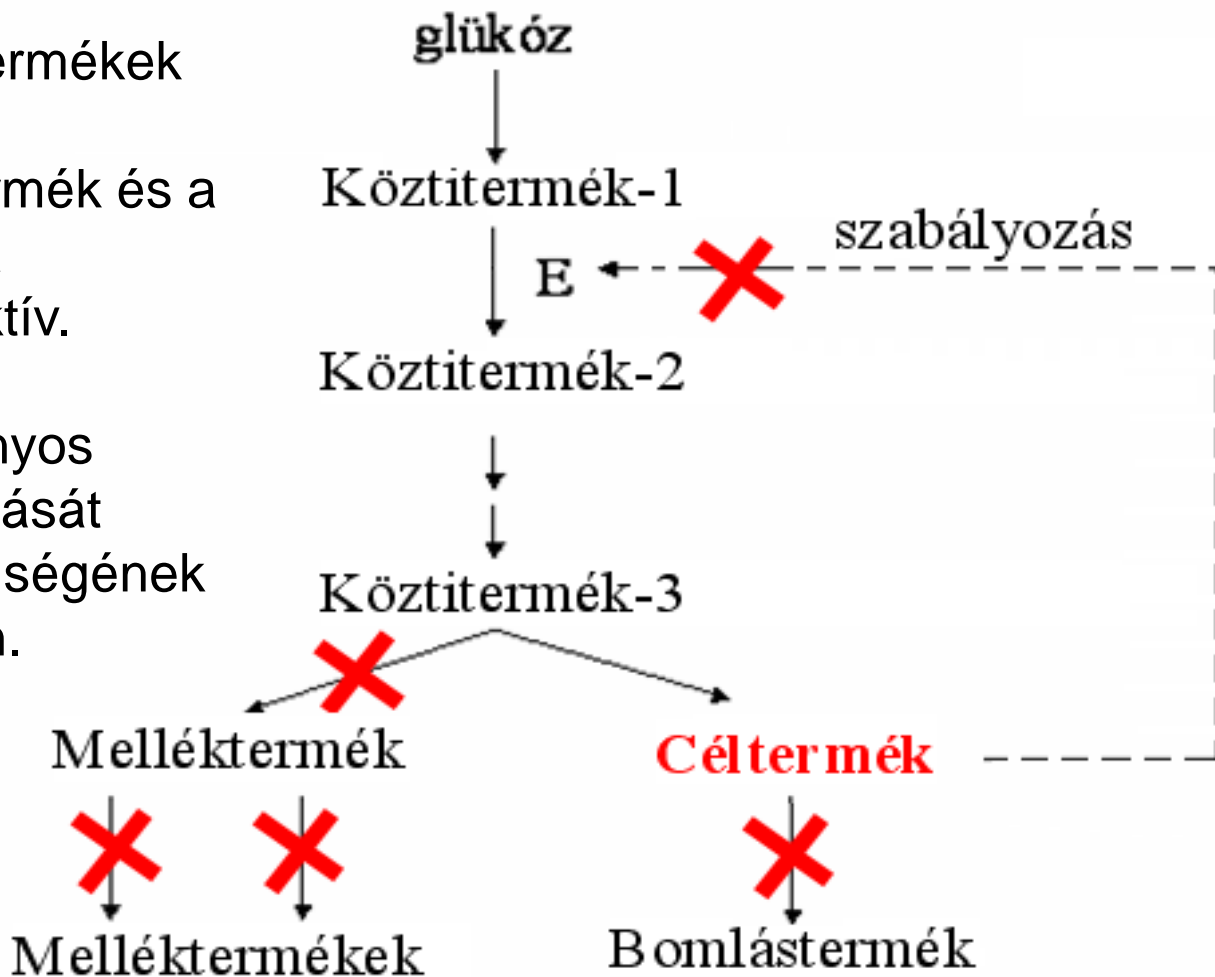
Az elsődleges anyagcsere termékek előállításánál a génállományt úgy változtatják meg, hogy:

1. A bioszintézis út elágazásait lezárják, ezáltal minden anyag a céltermék irányába áramlik (auxotróf mutánsok). Ha ez létfontosságú molekulák előállítását érinti, akkor leaky (szivárgó) mutánsok, vagy tápoldatkiegészítés.
2. A terméket továbbalakító reakciólépéseket is lezárják.
3. Felfüggesztik a túltermelést megakadályozó mechanizmusokat (antimetabolit rezisztens mutánsok).



Anyagcsere mérnökség – metabolic engineering

- A mikroba számára a termékek egyformán fontosak.
- A céltermék – melléktermék és a céltermék – bomlástermék megkülönböztetés szubjektív.
- A piros áthúzások bizonyos anyagcsere lépések kiiktatását jelölik a **céltermék** mennyiségének maximalizálása érdekében.
- A mutációkkal ezen lépések kiiktatására törekszünk.



A TRIPTOFÁN ELŐÁLLÍTÁSA

Bioszintézis: szénhidrátokból sok lépéssel. A japánok oldották meg *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzsekkel

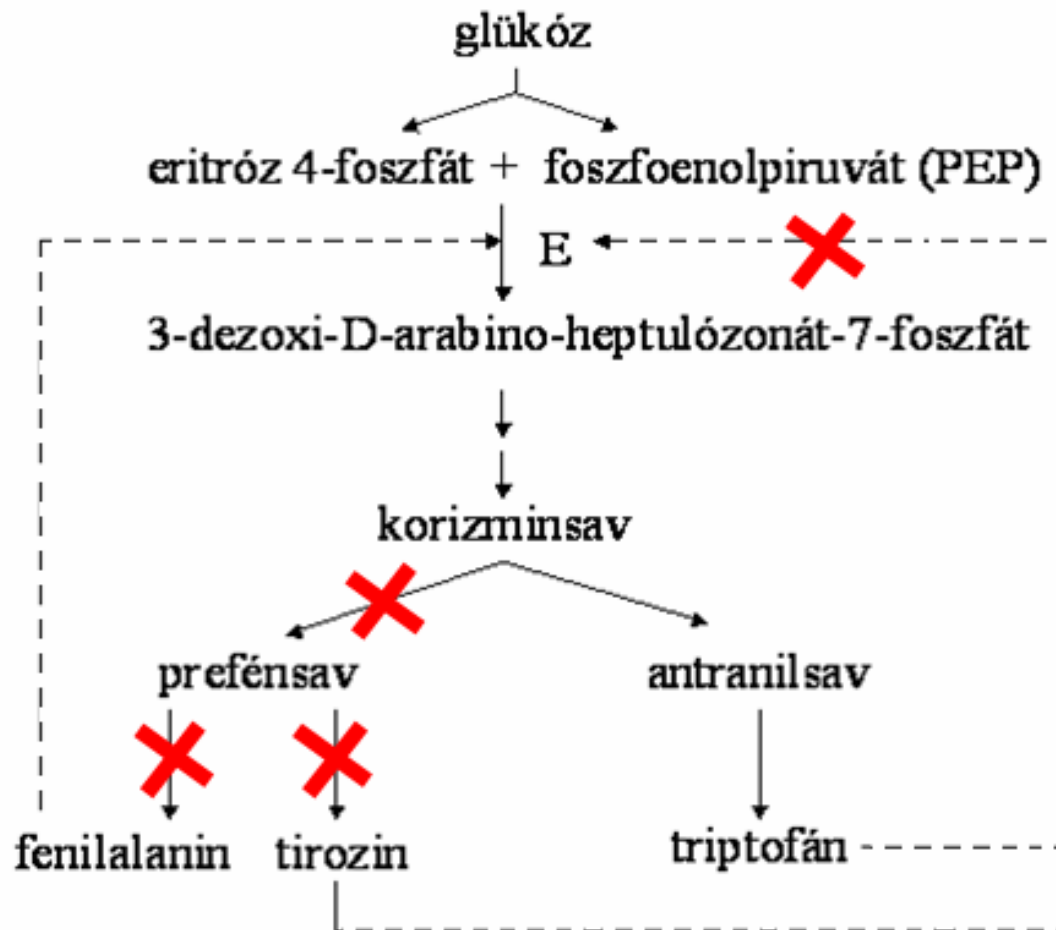
Anyagcsere-mérnöki szelekció:

Auxotrófiák:

Phe⁻, Tyr⁻,

Rezisztencia:

5-Me-Trp^r



Indukált mutáció antibiotikum termelő törzseknél

Az antibiotikumok bioszintézise a triptofán bioszintézisénel sokkal bonyolultabb, az anyagcsere mérnökség nem volt alkalmazható.

Ekkor a törzset „black box”-nak (fekete doboznak) tekintjük. → Nem foglalkozunk a köztes reakciólépések optimalizálásával, hanem csak a célra, a minél nagyobb antibiotikum termelésre koncentrálnak.

A mutáns törzsek közül a legjobb termelő képességűeket választjuk ki, és ezeket újabb és újabb mutációknak vetjük alá, és minden lépcsőben a legjobbakat használjuk ipari termelésre. → (Azonos a hagyományos növénynevelés és állattenyésztés stratégiájával.)



Penicillin termelés fokozása mutációval

A penicillin termelő törzs mutációs fejlesztése (50-es évek →)

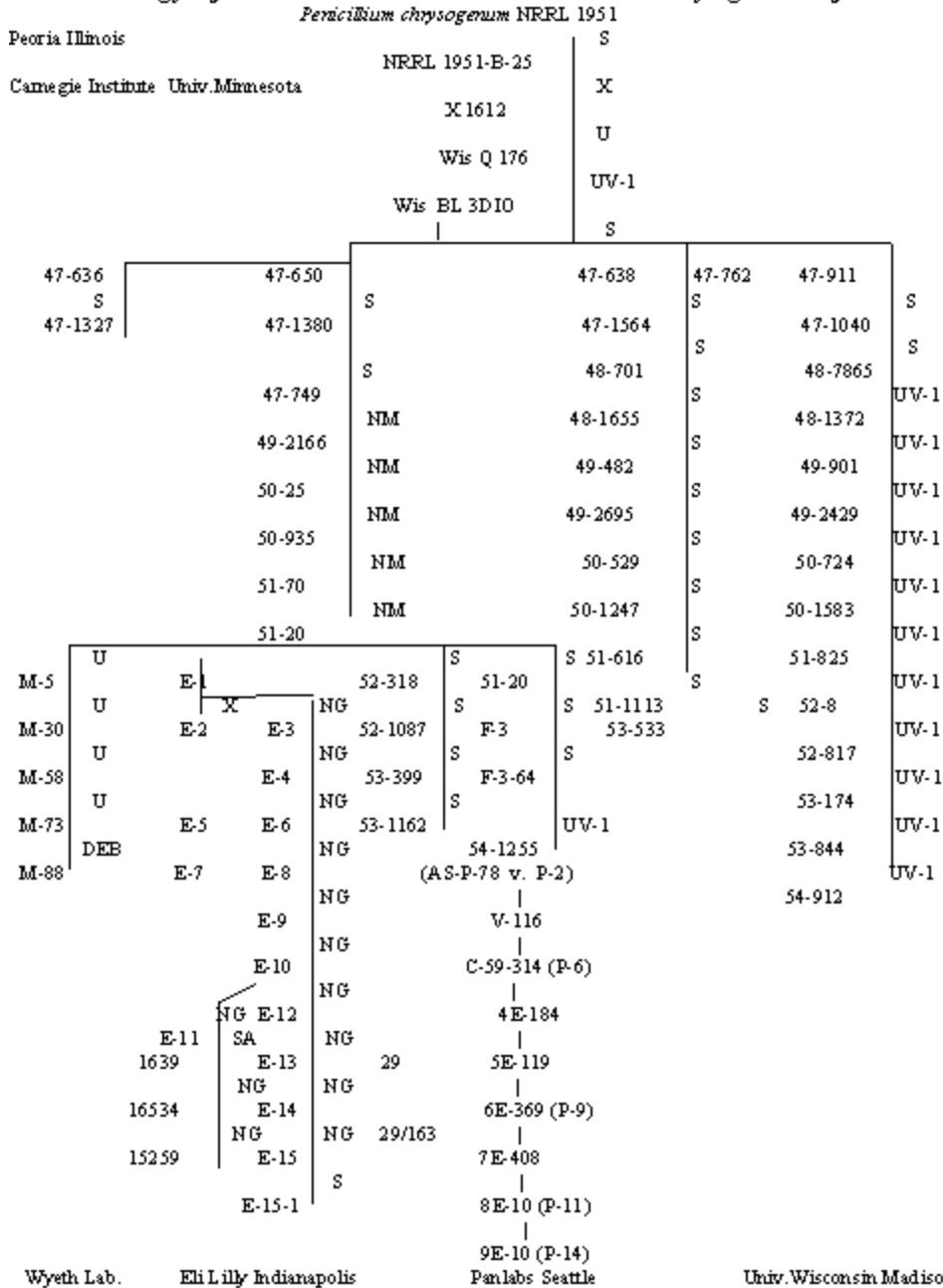
Hatóanyagtartalom a fermentáció végén:

1929 ~ 0,01 g/liter

1943 ~ 0,30 g/liter

2000 ~ 80 g/liter

Négy fejlesztő laboratórium törzsnemesítő tevékenysége a törzsjelzés feltüntetésével



BME Alkalm

Wyeth Lab.
West Chester

Eli Lilly Indianapolis

Parlabs Seattle

Univ. Wisconsin Madison

Alkalmazott módszerek: S= szelekció,

X= röntgenbesugárzás,

UV= ultrabolya kezelés,

M= metil-bis(β-k bretil)am n,

NG= nitrozo-guanidin,

NM= nitrogénmustár

M-5	U	E-1		52-318	S	51-20	S 51-616	S	51-825	UV-1
	U	X	NG		S		S 51-1113	S	52-8	UV-1
M-30		E-2	E-3	52-1087		F-3	53-533			UV-1
	U		NG		S		S		52-817	
M-58			E-4	53-399		F-3-64				UV-1
	U		NG		S				53-174	
M-73		E-5	E-6	53-1162				UV-1		UV-1
	DEB		NG			54-1255			53-844	
M-88		E-7	E-8			(A S-P-78 v. P-2)				UV-1
			NG			V-116			54-912	
			E-9							
			NG							
			E-10			C-59-314 (P-6)				
			NG							
			NG E-12			4 E-184				
		E-11	SA	NG						
		1639	E-13	29		5E-119				
			NG	NG						
		16534	E-14			6E-369 (P-9)				
			NG	NG	29/163					
		15259	E-15			7E-408				
				S						
			E-15-1			8E-10 (P-11)				
						9E-10 (P-14)				

Wyeth Lab. Eli Lilly Indianapolis Panlabs Seattle Univ. Wisconsin Madison
 West Chester

Ak alkalmazott módszerek: S= szelekció, X= röntgenbesugárzás, UV= ultrahelyes kezelés,
 M= metil-bis(β-kbretil)amin, NG = nitrozo-guanidin, NM = nitrogénmustár

Indukált mutáció - értékelés

Nem célzott, irányított változtatás. A sokféle mutánsból szelekcióval kell kiválasztani a nekünk kedvező változásokat hordozókat.

~70 éve művelik, klasszikus technika.

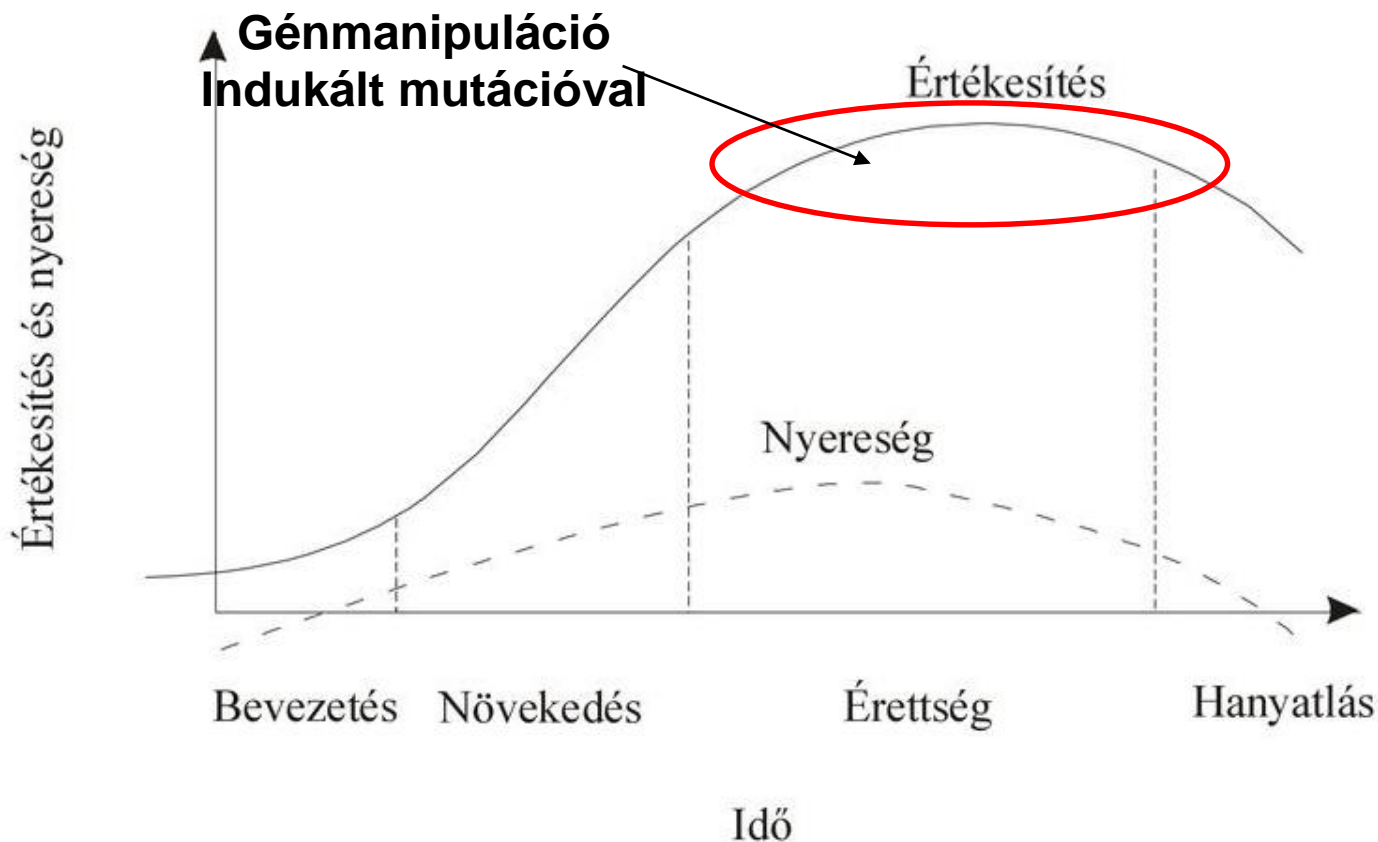
Veszélyessége kicsi, mert:

- inkább elvesz, mint hozzáad a tulajdonságokhoz
- emiatt a mutánsok kevésbé életképesek, mint a vad törzsek – a természetbe kikerülve nem versenyképesek
- zárt térben (üvegedények, fermentorok) szaporítják, a környezetbe csak véletlenül kerülhetnek.



Az indukált mutációval végzett génmanipulációval előállított termékek becsült helye a termék életciklus görbén

A diagram forrása: Dr. Bíró-Szigeti Szilvia egyetemi adjunktus, BME-MVT Marketing I. 6. előadás, Termékpolitika, 18. dia
<https://slideplayer.hu/slide/12168965/>



Egy termék életgörbe alapmodellje

