

3. el adás: Génmanipulációs technikák

A génmanipuláció, a gének szándékos megváltoztatása egy organizmusban, vagy átvitele egy másik organizmusba. Úgy kell átvinnünk ezt a tulajdonságot, ezt a megváltozott vagy új gént, hogy az öröklődéssel legyen, a manipulált organizmus utódjaiban is fennmaradjon a változás. Az új tulajdonságú élőlény teljes populációjában, minden utódjában jelenjen meg a genetikai változás.

3.1 Indukált mutáció:

A gének egyik lehetséges átalakítási módszere az indukált mutáció. Indukált, azaz szándékosan létrehozott mutációról van szó. Az eddigiekben a spontán mutációt tárgyaltuk, a természetben környezeti illetve belső hatásokra állandóan, véletlenszerűen jönnek létre mutációk. E folyamat ellenében dolgoznak a repair mechanizmusok, amelyek kijavítják, eltüntetik a mutációk egy részét, és ezáltal kialakul egy egészséges mutációs ráta.

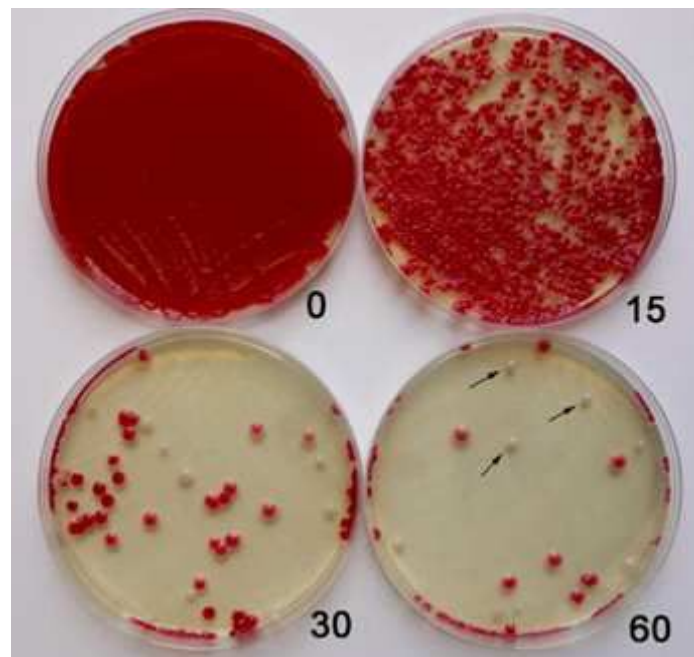
Amikor indukált mutációt végzünk, akkor ezt reprodukáljuk, kontrollált laboratóriumi körülmények között és sokkal intenzívebben. Olyan hatásoknak tesszük ki a sejteket, amelyek sokkal gyakrabban idéznek elő mutációt, mint a természetes környezet. Majd ezt követően a természetes szelekció helyett mesterséges szelekciót alkalmazunk a számunkra előnyös mutációt hordozó sejtek kiválasztására. Ugyanazt a módszert követjük ilyenkor, mint a természet, csak a mutációs rátát és a szelekciót is a biotechnológusok aszerint állítják be, hogy a nekik kedvező mutáns törzseket izolálhassák.

Az indukált mutációk létrehozása ugyanazokkal a hatásokkal érhető el, mint a spontán mutációnál: kémiai ágensekkel vagy nagy energiájú sugárzásokkal. A természetben nagy energiájú sugárzás érkezik a Napból, fakadhat ki a zetek radioaktivitásából vagy kozmikus sugárzás a galaxisból. De ezek a természetben „szerencsére” elég ritkán jönnek. Viszont, ha a tenyészetet egy UV lámpa alá helyezzük, illetve Röntgen-vagy radioaktív sugárzásnak tesszük ki, akkor nagyon sok mutáció jön létre. Mutációt okoznak egyes vegyszerek, ezeket mutagéneknek (= mutációt generál, mutációt hoz létre) nevezik. Használatos például a salétromos sav (egyszerű szeretlen vegyület) vagy a N-mustár, nitrozo-guanidin, vagy a mitomicin (ez egy mikrobák által termelt anyag). Ezek kémiai reakcióba lépnek a DNS egyes bázisaival, pontmutációkat idéznek elő.

A mutációk gyakorisága attól is függ, hogy mennyi ideig tesszük ki a mutagén hatásnak a sejteket. (Pl. 5 vagy 15 percre tesszük be az UV lámpa alá).

A mutáció hatása

A képen piros színnel jelennek meg egy piros festékanyagot termelő mikroorganizmus telepei (a neve: *Serratia marcescens*).



1. ábra Példa mutáció hatására

(Kultúrtörténeti érdekesség: a *Serratia marcescens* szeret a kenyérben, annak belsejében élni. Ilyenkor a piros színanyag megjelenik a kenyéren is. A középkorban ezt a piros színt vérnek vélték, és a „véres kenyér”, „véres ostya” csodájaként tartották számon.) A vad típusú *Serratia marcescens* piros színanyagot termel. Ha egy Petri csészében a szilárd táptalajra egy sűrű tenyészeteket szélesztünk, akkor néhány napos szaporítás után a telepek teljesen benövik a felületet (0 jelzésű Petri csésze, ez a kísérlet kontrollja). Ugyanígy elkészített Petri csészéket UV lámpa alá teszünk az 15, 30 illetve 60 percre, akkor azonos szaporítás után láthatjuk, hogy sokkal kevesebb telep nőtt ki. Ennek oka az, hogy a besugárzás (és minden intenzív mutagén kezelés) nem csak mutációkat idéz elő, hanem a sejtek egy jelentős részét el is pusztítja. (A pusztulás az UV lámpa alatt töltött idő függvényében exponenciális törvényszerűséget követ.) Ha 30 percre tesszük be ugyanazt a tenyészetet az UV lámpa alá, akkor már az látszik, hogy alig maradt néhány túlélő. 60 perc után még kevesebb túlélő marad. A túlélők között viszont a mutánsok gyakorisága egészen nagy lesz. A jobb alsó Petri csészén fekete nyilakkal jelölve láthatunk olyan mutánsokat, melyek túléltek a sugárzást, de fehérek lettek. Ezek a mutánsok a piros színanyag termelésének tulajdonságát elvesztették. A mutáció során ezeknél pontosan azt a gént találta el a sugárzás, ami a piros színanyag termeléséért felelős.

A végén a túlélés nagyon kismértékű, de a túlélők között sok mutáns található. (Mutációs kísérleteknél azt a gyakorlati szabályt alkalmazzák, hogy a mutációs kezelést 90%-os pusztulásig célszerű folytatni. A túlélők 10% között már nagy a mutánsok aránya.)

Mire jó a mutáció, mire lehet ezt használni?

A mutáció nem irányítható, tehát nem tudjuk meghatározni azt, hogy melyik gént akarjuk kiléni és melyikeket fogjuk meghagyni. A mutációnál a valószínűség elvét követjük, nagyon sok mutáció létrehozásával csak lesz olyan, mely megfelel a biotechnológus szándékainak. Ez egy statisztikus módszer, sok mutáns közül kell kiválogatnunk azt, ami nekünk megfelel.

Ez a mikrobiológusok számára egy rabszolgamunka, hogy valamilyen szempont szerint több száz túlélt kell levizsgálni, hogy az adott szempontból melyik a legjobb.

Szerencsére vannak trükkök, szelektív táptalajokkal ki lehet válogatni bizonyos típusú mutánsokat. Így is sokat kell dolgozni, de közel sem annyit, mintha az összes mutánst meg kellene vizsgálnunk.

Milyen típusú mutánsok vannak?

Nagyon gyakran használnak ún. hiánymutánsokat vagy más néven auxotróf mutánsokat. A hiánymutánsokban valamelyik gén tönkrement és emiatt egy fontos anyagot (ideális esetben csak egyet) nem tudnak előállítani. Ilyen anyag lehet egy bizonyos aminosav, egy nukleotid, vagy egy vitamin. Hiánymutánsoknak nevezzük ezeket, mert az anyagcseréjükben egy reakció hiányzik. Ha a hiánymutánsok nem tudják saját maguknak előállítani a létfontosságú anyagot, akkor nem tudnak szaporodni enélkül - ha csak készen meg nem kapják a táptalajból. Ezt lehet kihasználni a szelekcióra, hogy csak akkor maradnak meg, ha a táptalajba belekeverjük ezt a bizonyos egy komponenst, ami náluk hiányzik.

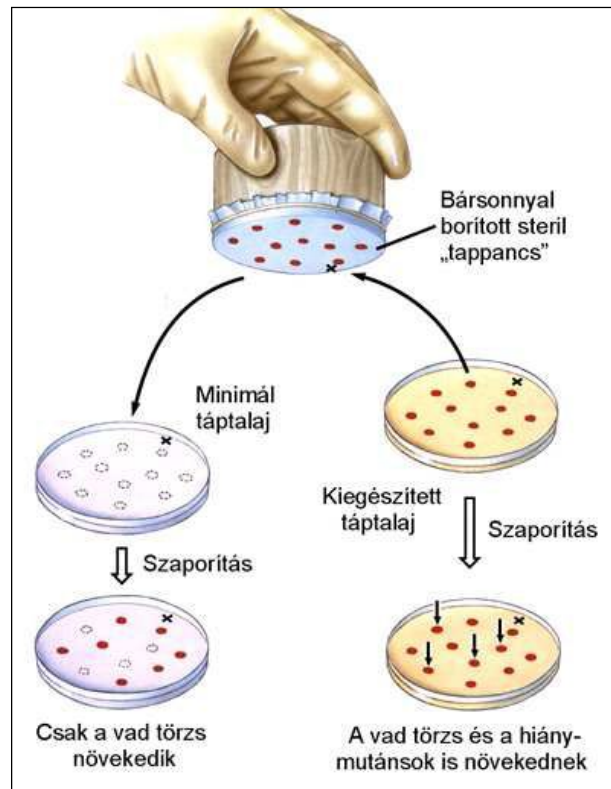
A nem mutálódott (vad típusú) törzsek ezt a fontos anyagot elő tudják állítani. Tehát ezek minden táptalajon maradnak, ha van ez a bizonyos komponens, ha nincs. Ezek mellett kell megtalálni a hiánymutánsokat, emiatt kell sok-sok törzset bevizsgálni. De lehet olyan technikákat kitalálni, ahogyan a hiány mutánsokat azonosítani és izolálni lehet.

Vad törzs (prototróf): Az eredeti nem mutálódott törzs, kiegészítetlen táptalajon is marad.

Mutáns törzs (auxotróf): Melynek speciális táplálék anyag igénye van. Ez egy vagy néhány komponenst igényel a táptalajban, mert csak ekkor marad. Tehát a szelektív növekedéssel lehet valamiféle különbséget tenni közöttük.

Hogyan lehet ezt a különbséget észlelni?

A mikrobiológusok egy speciális eszközt, a képen is látható „bársony tappancsot” használják erre a célra. A Petri csésze méretével azonos méret felületre steril bársony réteget visznek fel. A bársony felület azért jó, mert ha rányomják egy táptalaj felületére, akkor rajta lévő telep egy része átkerül a bársonyra, és ha bélyegszerűen áthelyezik egy másik táptalajra, akkor pontosan ugyanazt a rajzolatot adja, mint ami az eredeti Petri csésze felületén volt. Először egy kiegészített táptalajon elnevelik a telepeket. Megjelennek a piros pontok, ezek a telepek. A képen, a Petri csészéken látható x jelzés



azért van, hogy véletlenül el ne forgassák a 2. ábra: A vad és a mutáns törzs szétválasztása tappancsot. Ha ugyanis elforgatják, akkor már a mintázatot nem tudják azonosítani, és az egyes telepek sem azonosíthatók. Tehát elnevelik a telepeket, rányomják a bársony tappancsot, és ezt rányomják egy olyan táptalaj felületére, amelyben hiányzik a kiegészítő komponens (ezt minimál-táptalajnak nevezik). Az ábrán az üres körök jelölik a tappanccsal átvitt telepek helyét.

Szaporítás után az átvitt sejtek egy része ki fog nőni, és látható telepet képez, mások pedig nem. Ami kinő, az a vad törzs, hiszen az a kiegészítő komponens nélkül is tud növekedni. Ami nem nő ki, az az auxotróf mutáns, mely csak akkor tudott növekedni, ha a kiegészítő komponens is jelen van.

Ezek után fogják a két Petri csészét, egymásra teszik, és az x jeleket is fedésbe hozzák. Erősen fényel átvilágítva olyan telepeket keresnek, ami a minimál táptalajról hiányzik (az ábrán kis fekete nyilak jelölik). Ezek a hiánymutások, ezeket tenyésztik és vizsgálják tovább. Természetesen ez is egy munkás folyamat, de csak azokat az elemeket kell megvizsgálni, amelyek a másikon táptalajon nem nőttek ki.

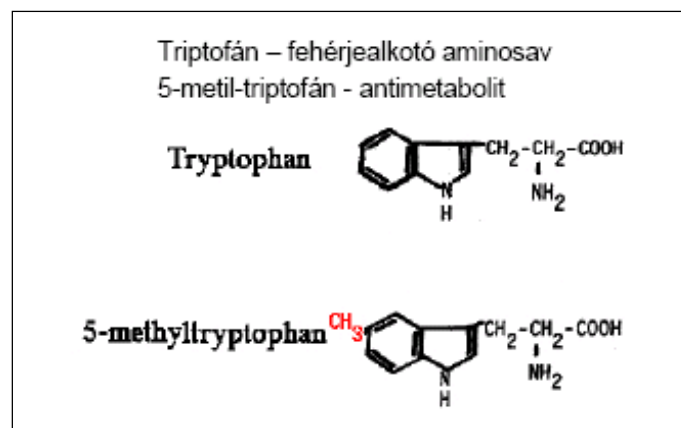
Rezisztens vagy ellenálló mutások

A vad törzset abban térnek el, hogy valamely károsító, mérgező anyag jelenlétével sokkal nagyobb mértékben képesek elviselni. A mutáció révén szert lehet tenni olyan tulajdonságokra is, hogy bizonyos károsító anyagok ellen a sejt védettséget szerezzen.

Az ilyen mutánsok izolálása viszonylag egyszerű. Olyan táptalajra kell rávinni a sokféle mutáns vegyes tenyészetét, melyben a vizsgált károsító anyag is benne van. Csak azok fognak kinéni, melyek az adott anyagra rezisztensek. Amelyik nem rezisztens, az elpusztul.

Antimetabolitok

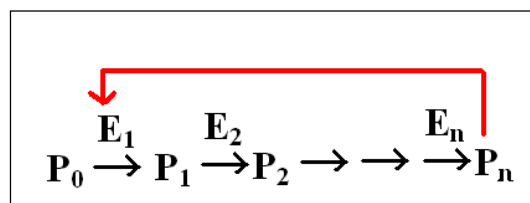
Az antimetabolit az egy valódi metabolit-hoz hasonló molekula. (Kémiai szerkezete hasonló a valódi metabolit-hoz, melyet általában szintetikus úton készítenek el pl. az eredeti metabolit-ra rátesznek egy metil csoportot.) A szerkezeti hasonlóság a sejten belül bizonyos funkcióknál azt jelenti, hogy be tudja tölteni az eredeti metabolit szerepét, más funkcióknál pedig nem tudja betölteni.



(Például vegyünk, egy aminosavat, legyen ez a triptofán. Ez egy metabolit, normális esetben beépül a fehérjékbe. Antimetabolitja csak egy metil csoporttal különbözik, az 5-metil-triptofán. Ez már vagy nem épül be a fehérjékbe eleve, mert rossz a szerkezete, vagy olyan fehérjék jönnek létre vele, melyek rosszul működnek.)

A rezisztencia jellegének megértéséhez szükséges az allosztérikus szabályozás mechanizmusának felelevenítése (Biológia alapjai tantárgy, BSc)

Az allosztérikus szabályozás egy enzim szintű szabályozás, az enzimek működését szabályozza. Egy metabolitnak bioszintézise során általában sok lépésen kell átesnie.



3. ábra: Végtermék gátlás

Tehát az $E_1, E_2 \dots E_n$ enzim szépen sorban végzik a reakciókat. A legegyszerűbben sejteken belül is vannak olyan szabályozások, amelyek a pazarlást megakadályozzák. Minden sejten belül van egy egészséges, normál szintje a metabolitoknak, többet termelni pazarlás.

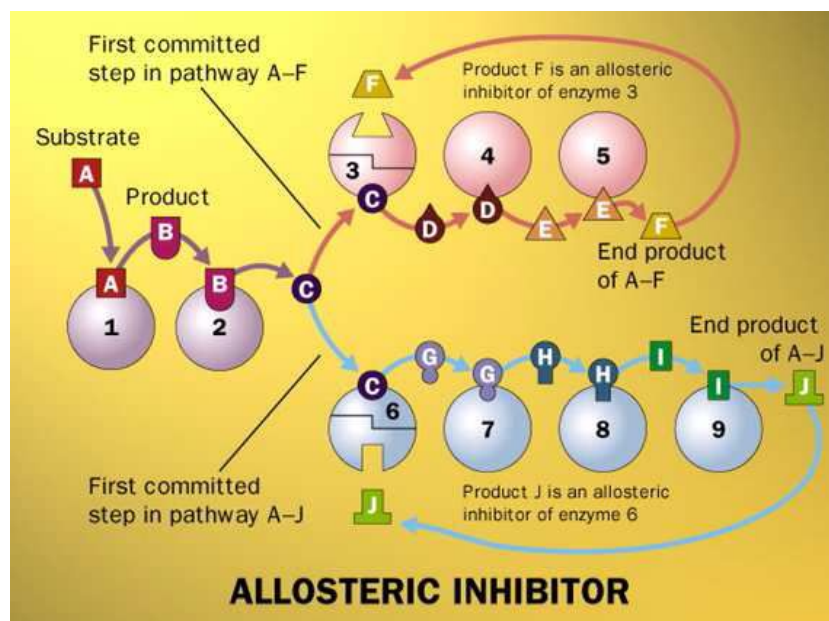
Aki pazarol, az evolúciós hátrányba kerül. Tehát kell egy szabályozás, amely leállítja a bioszintézist, ha túl sok van a végtermékéből.

Ez a szabályozás az allostérikus szabályozás. Ez a bizonyos anyag a bioszintézis legelső enzimének a felületére kötődik és leállítja vagy lelassítja az enzim működését. A végtermék jelenléte befolyásolja az enzim aktivitást. Ezt hívják végtermék gátlásnak. A végtermék gátlás (feed back inhibíció): egy reakciólánc végterméke visszahat és lefékezi saját termelését, a legelső enzim működését. Tehát nem az enzimreakció saját terméke hat vissza, hanem egy hosszú reakcióláncból a legvégső termék szabályozza a legelső enzimet.

Miért a legelső enzimre hat?

Mert ez a célszerű, gazdaságos megoldás. Ha a második vagy a harmadik enzimre hatna, akkor a P1 (vagy P2) anyag (köztitermék) termelődne, és felhalmozódna, mert a továbbalakulása lelassult. Ez szintén pazarlás. Az a célszerű, ha már a legelső reakciónál megtörténik a beavatkozás és akkor sem a P1 sem a P2 sem a P3 nem fog termelődni.

Vannak elágazó anyagcsere láncok is, ahol az első lépések (az ábrán az 1. és 2. lépés) még közösen megy az anyagcsereúton. Majd elágazik, és kétféle végtermék keletkezik. A képen látható módon az 1. 2. 3. 4. 5. enzim végterméke az F molekula, a 6. 7. 8. 9. enzim végterméke a J molekula. Ebben az esetben a végtermék gátlás a következő módon történik: az F és J végtermék visszahat az elágazás utáni első lépésre. A 3. és 6. enzimen látunk egy lépcsős vonalat, ami azt jelöli, hogy ez egy átkapcsolható, allostérikus enzim, amelyek valamilyen molekula hatására képesek az aktivitásukat megváltoztatni. Ha a J-ből van elegendő, akkor az csak a kék oldalt fékezi le. Ebben az esetben a kék oldalra kevesebb anyag fog áramlani, a piros oldalon zavartalanul áramlik tovább. Ez fordítva is működik, az F molekula fölöslege a kék oldalra tereli az anyagáramot. A lényeg, hogy mindkét oldal esetében a végtermék (J és F) az elágazás utáni első lépésre hat vissza.



4. ábra: Elágazó reakcióláncok szabályozása

Az antimetabolit rezisztencia értelmezése:

Az antimetabolitok szerkezeti hasonlóságuknál fogva szintén kapcsolódhatnak az enzimekhez, és 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.

Például ha a triptofánra gondolunk, amely egy teljesen közönséges aminosav. Minden fehérjében előfordul. Ennek antimetabolitja az 5-metil-triptofán, ami mindössze egyetlen egy metil csoportban tér el tőle. Ez a metil csoport már elég arra, hogy az 5-metil-triptofán a fehérjébe nem tud beépülni, viszont az 5-metil-triptofán úgy viselkedik, mintha valódi triptofán lenne, jelen és képes leállítani a triptofán bioszintézisét. A lényeg, hogy az enzimfehérje felülete úgy érzékeli, hogy triptofán kötődött, de ez igazából egy 5-metil-triptofán van jelen. Ha a sejtben eláll a triptofán termelés, akkor a sejt elpusztul, ugyanis triptofán hiányában nem lehet fehérjéket szintetizálni. Tehát egy normális egészséges sejt az antimetabolittól elpusztul. Csak azok a mutánsok élnek túl az 5-metil-triptofános kezelést, amelyeknek ez a szabályozó mechanizmusa a mutáció miatt nem működik.

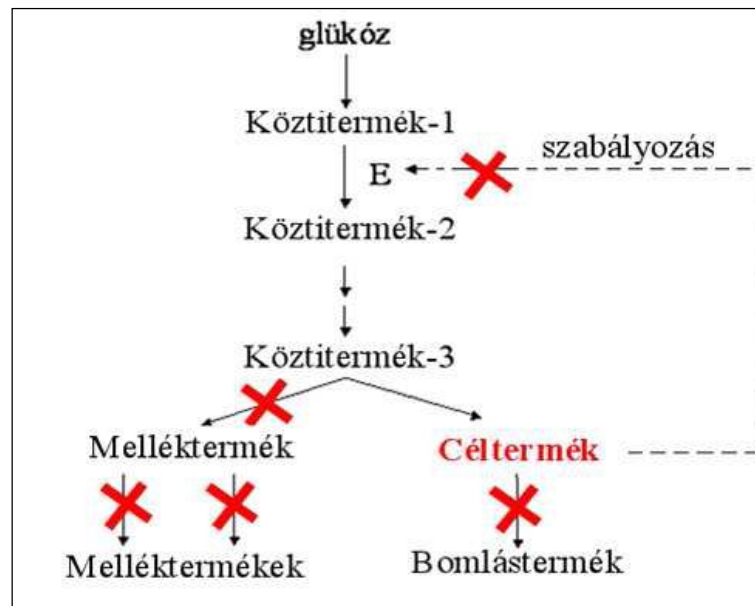
A mutáció következtében annak az enzimnek az a felülete „romlott el”, ahova az antimetabolit beköt. Ennek az a következménye, hogy állandóan, nagy mennyiségben, szabályozás nélkül termeli a végterméket. Ha egy biotechnológus ezt az anyagot szeretné kinyerni és eladni, akkor pont ilyen mutánsokat keres, amelyek nagy mennyiségben termelik ezt az anyagot. A biotechnológusok ezért kutatják az antimetabolit rezisztens mutánsokat, mert ezek minden bizonnyal túltermelők. Ezek megkeresése viszonylag egyszerű, mert ha a mutáció után a túlélő egyedeket olyan táptalajra visszük, mely antimetabolitot tartalmaz, akkor az összes normális szabályozású sejt elpusztul, és csak azok fognak kinőni, amelyek rezisztensek, ellenállóak. Tehát a vad törzs elpusztul, a rezisztens mutánsok, vagy túltermelő mutánsok pedig túlélnek az antimetabolitos kezelést. Ezeket sokkal egyszerűbb izolálni, mint a hiánymutánsokat (melyről korábban volt szó a bársony tappancsos eljárásnál).

Ipari termelés túltermelő mutánsokkal

Sokféle elsődleges anyagcsere-terméket termelnek ilyen mutánsokkal és ennek kialakult egy közös gyakorlata, ami független a terméktől, ugyanazokat az eljárásokat tucatnyi termék előállításánál alkalmazzák. 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 túltermel mutánsokhoz.

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



5. ábra: Az anyagcsere mérnökség

Általánosságban, a konkrét terméktől függetlenül szemlélve a folyamatot:

A mikroorganizmus szénforrása általában valamilyen szénhidrát, legtöbbször glükóz. Ebből sok lépésben, köztitermékeken keresztül jut el a végtermékekig. Az anyagcsereutak jellemzően elágaznak, egyes köztitermékekből többféle végtermék is lehet. Mikroba számára a termékek egyformán fontosak (a céltermék - melléktermék megkülönböztetése szubjektív, emberi döntés). A céltermék további reakcióval átalakulhat, elbomolhat. A fekete nyilak az anyagcsereutakat mutatják, a szaggatott vonal a szabályozást jeleníti meg. Ez a korábban tárgyalt allosterikus szabályozás, amelyben a céltermék képes visszahatni az utat termelő enzimre. A piros áthúzások bizonyos lépések kiiktatását jelölik. A mutációkkal ezen lépések kiiktatására törekszünk.

Anyagcsere-mérnöki elvek

A primer metabolitok előállításánál a génállományt úgy változtatják meg, hogy:

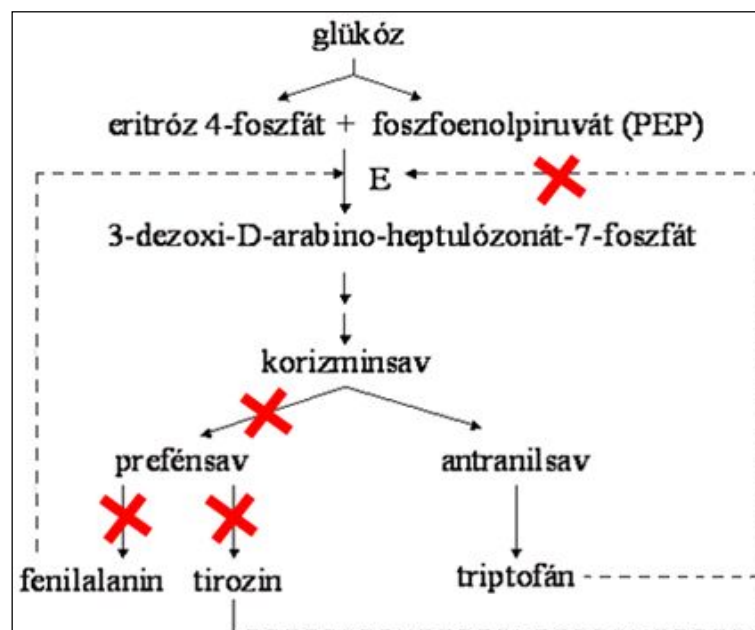
1. A bioszintézis utak elágazásait lezárják, ezáltal minden anyag a céltermék irányába áramlik (a melléktermékekre auxotróf mutánsok). Azt akarjuk elérni, hogy ne keletkezzenek melléktermékek, csak a céltermék. Olyan mutánsokat kell keresnünk, me-

lyek ezeket a reakciókat nem tudják. Ezek a melléktermékekre hiány mutánsok, tehát a melléktermékeket nem tudják előállítani. Ha ez létfontosságú molekulák előállítását érinti, akkor vagy leaky (szivárgó) mutánsokat keresünk, amelyek kis mennyiségben termelik a hiányzó metabolitot, vagy a tápoldatot kiegészítjük a hiányzó anyaggal.

2. A terméket továbbalakító reakciólépéseket is gátoljuk meg. Sokszor előfordul, hogy az általunk kiválasztott termék nem a legvégső állomása egy reakciósornak, hanem még tovább alakul. A már megtermelt termék elbomlásának megakadályozására olyan mutánsokat kell létrehozni, melyek ezt a reakciót nem képesek végrehajtani.
3. Megszüntetik a túltermelést megakadályozó szabályozó mechanizmusokat (antimetabolit rezisztens mutánsok).

Vizsgáljuk meg a fentieket egy konkrét példán:

A triptofán előállítása



6. ábra: A triptofán előállítása

A séma ugyanaz, mint a 4. képen volt, csak most a vegyület nevek is fel vannak tüntetve. A szabályozási rendszer annyival bonyultabb, hogy ez esetben mindhárom végtermék visszahat a kulcsenzim működésére.

Mit kell tennünk akkor, ha triptofán(termel törzse)t akarunk el állítani?

Hiánymutásokra van szükségünk: Phe⁻, Tyr⁻, Ezeknél a – jel azt jelöli, hogy erre a kettőre hiánymutás ez a törzs, de triptofánt képes el állítani.

A második szempont a tovább alakulás akadályozása volt. Triptofán esetében nem beszélhetünk tovább alakulásról. A triptofánnak az a sorsa, hogy fehérjébe épül be, ezt a tovább alakulás során nem kell akadályozni.

A harmadik szempont az volt, hogy az allosztérikus szabályozást felfüggesztjük, 5-metiltriptofán rezisztens mutánsokat izolálunk.

A japánok oldották meg el ször, *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzsekkel.

Auxotrófiák: Phe⁻, Tyr⁻

Rezisztencia: 5-Me-Trp^r

Indukált mutáció antibiotikum termel törzseknél

Vannak más típusú biológiai termékek is pl. az antibiotikumok. Ezek bioszintézise soklépéses és bonyolult folyamat. Ezekre az anyagcsere mérnökség az nem alkalmazható. Túl bonyolult hozzá. Ebben az esetben egy egyszeri modellt alkalmazunk, nem nézzük meg a bioszintézis egyes lépéseit és nem próbáljuk meg a különböző reakciókat kiláncolni. Az egész törzset fekete doboznak tekintjük, aminek egy kimenete van (a minél nagyobb antibiotikum termelés). Egy lombikban megvizsgáljuk a törzset, hogy mennyi antibiotikumot termel. Elkezdjük mutálni, kezeljük és ezután megvizsgáljuk a mutánsokat, majd a nagyobb termelésűeket kisselektáljuk és ezeket újra mutációnak vetjük alá és újra megvizsgáljuk. Egy fokozatos törzsjavítást végeznek el ebben az esetben. Ez egy nagyon munkás, de működőképes folyamat. A folyamatot egy mutációs törzsfán tanulmányozhatjuk.

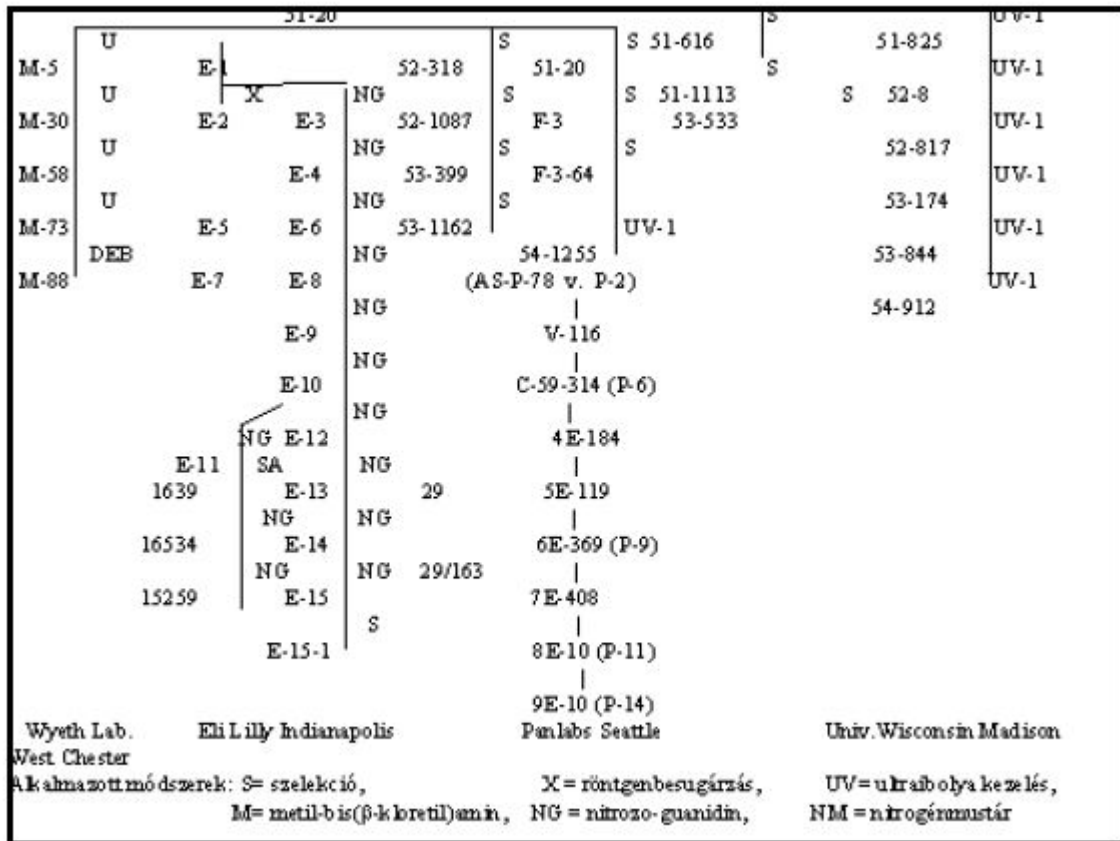
Ez olyan, mint a családfa, csak az egyes sorok egy generáció helyett egy-egy mutációs kezelési lépést jelent (ultraibolya, vagy röntgensugárzás, vegyszerezés)

A penicillin termelés fokozása mutációval:

Amikor 1929-ben Alexander Fleming a penicillinnel elkezdett foglalkozni, akkor 10 µg/l nagyságrendben termelt a penicillin. Tehát biológiailag kimutatható, de rendkívül kis mennyiségben.

1943-ban már 300 mg/l mennyiségben termelt a penicillin. (Klinikai kipróbálására 1943-ban került sor.)

2000-re több ezer mutációs lépés után elérték a 80 g/l mennyiséget.



7. ábra: Mutációs törzsfá

A 7. ábrán a különböző laboratóriumok penicillin termelő törzseinek fejlesztési útvonalait láthatjuk.

Az indukált mutációs technológia értékelése:

Ez egy nem célzott technika, tehát a mutációnál „nem lehet tudni, hogy hova talál.” Sokféle mutánsból szelekcióval kell kiválasztani azt, ami a nekünk kedvező tulajdonságot hordozza.

Kb. 70 éve megvelik ezt a technológiát. A penicillin volt az, amit a II. világháború után kifejlesztettek, és azóta folyamatosan alkalmazzák. Az indukált mutációval előállított törzsek veszélyessége kicsi, mert:

- mert a mutáció inkább elvesz, mint hozzáad egy tulajdonságot. Ha valamit mutációval kiiktatunk egy sejtből, az így elveszít egy tulajdonságot. Emiatt evolúciós hátrányban van a vad törzsekhez képest, azaz a mutánsok kevésbé életképesek, mint a vad törzsek, a természetbe kikerülve nem versenyképesek.

- Szaporításuk teljesen zárt, steril környezetben történik (üvegedényekben, fermentorokban) a természetbe csak véletlenül kerülhetnek.

Összességében elmondható, hogy ez egy biztonságos technika, az indukált mutációs génmanipuláció kockázata kicsi.