

III. Génmanipulációs technikák

Génmanipuláció:

a gének megváltoztatása, vagy átvitele egyik organizmus-ból a másikba → ezáltal az élőlények tulajdonságainak megváltoztatása.

A változás öröklődik, megjelenik a következő generációk-ban is.

Kitekintés: tudunk-e irányított, célzott génmanipulációt végezni?

→ a hagyományos növénynevelés és állattenyésztés és a génmanipuláció célja azonos: kedvező tulajdonságok létrehozása...

→ biotechnológiai módszer: mutációk létrehozásával

→ Lehetnek-e a mutációk célzottak, specifikusak?

→ kémcsőben, sejten kívül igen (rutin feladat)

→ mikróbában, laborban igen (jelenleg is kutatják)

→ magasabb rendű élőlényben → nehezen irányítható, veszélyes, kutatás tárgyát képezi, etikai kérdések...



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

replikáció



másolás

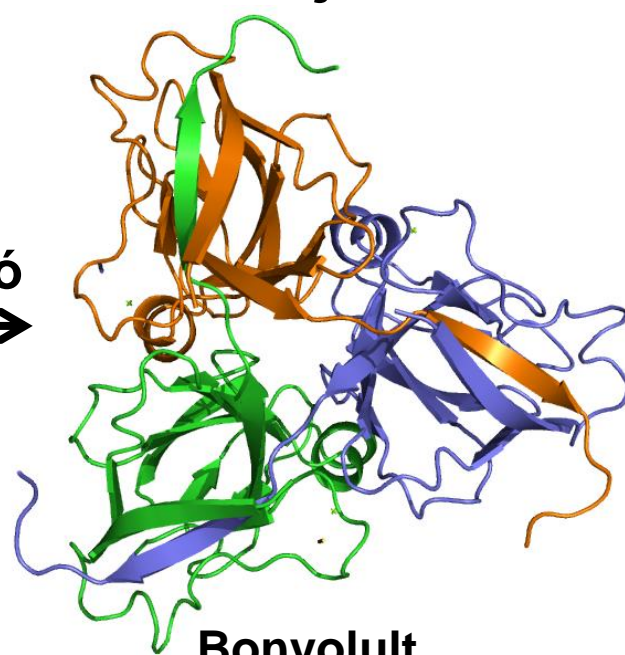
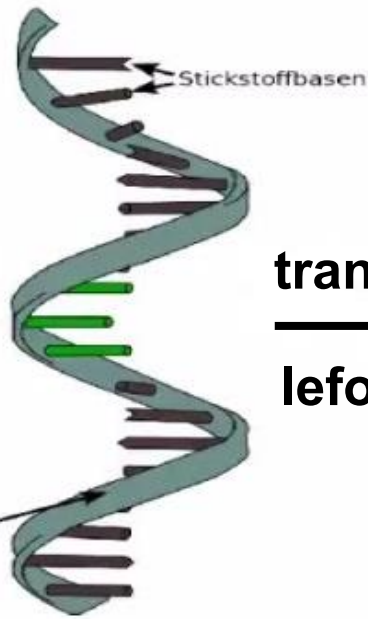
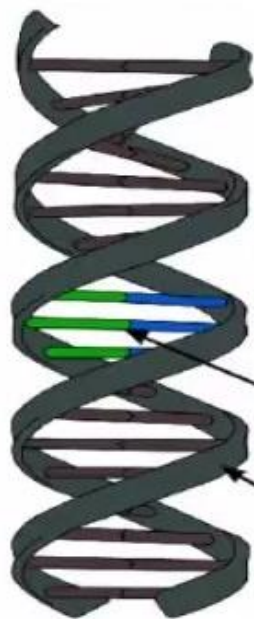
➤ Így viszont az RNS-ek és a fehérjék szerkezetére is kihat

➤ **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



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.



Mutációk

Pontmutációk: egy bázist, vagy bázispárt érintenek.

Ha csak egy bázis változik meg: egy aminosav változik meg a fehérjében

Ha egy bázis beépül, vagy kiesik: az egész utána következő szakasz értelmetlen lesz (shift mutáció)

Kromoszóma mutációk:

egy DNS szakaszt érintő kiesés (deléció), áthelyeződés (transzpozíció), megfordulás (inverzió)

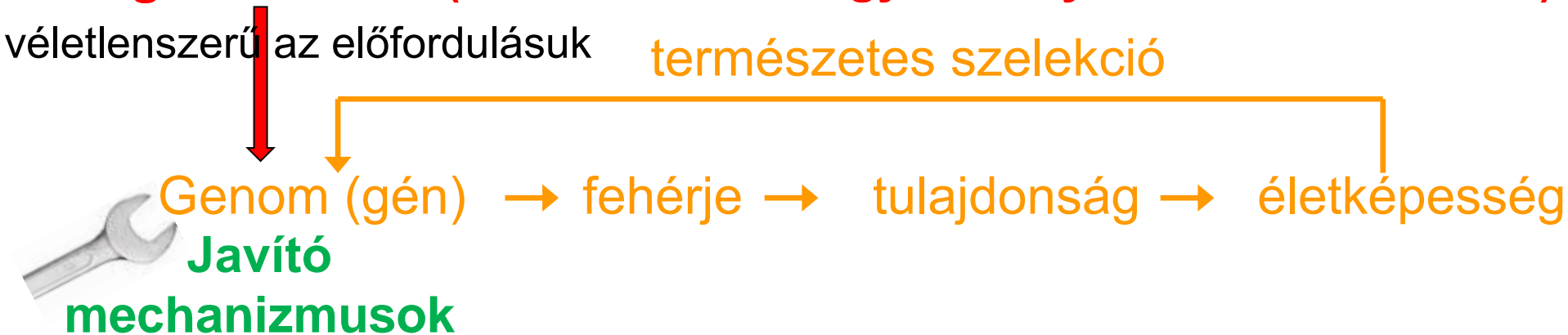
egyes kromoszómákat érintő változás: törés, megkettőződés, számbéli változás (géndózis): xxx, xyy, xxy, Down kór

egész kromoszómaszerelvényt érintő megsokszorozódás: pl.: xn (ploiditás)



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 (természetből jövő) vagy mesterséges (az ember által indukált).

Spontán mutáció → természetes szelekció

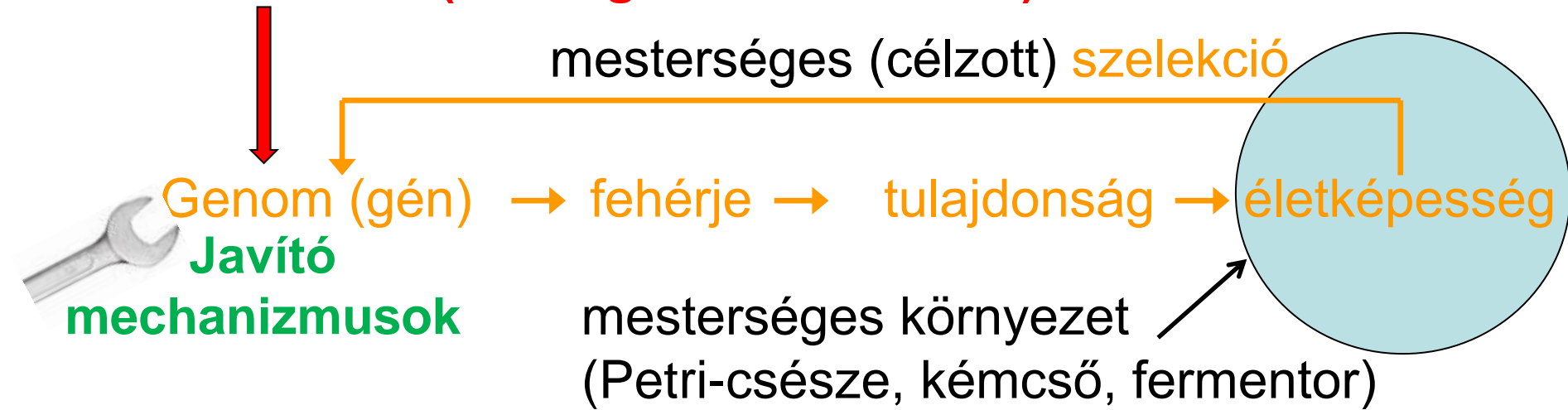
Indukált mutáció → mesterséges szelekció

~ növénynevelés, állattenyésztés



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.



III/1. Indukált mutáció

Mutációkat lehet előidézni:

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

Körülmények:

- kezelési idő (expozíció)
- sejtkoncentráció
- tápoldat összetétele

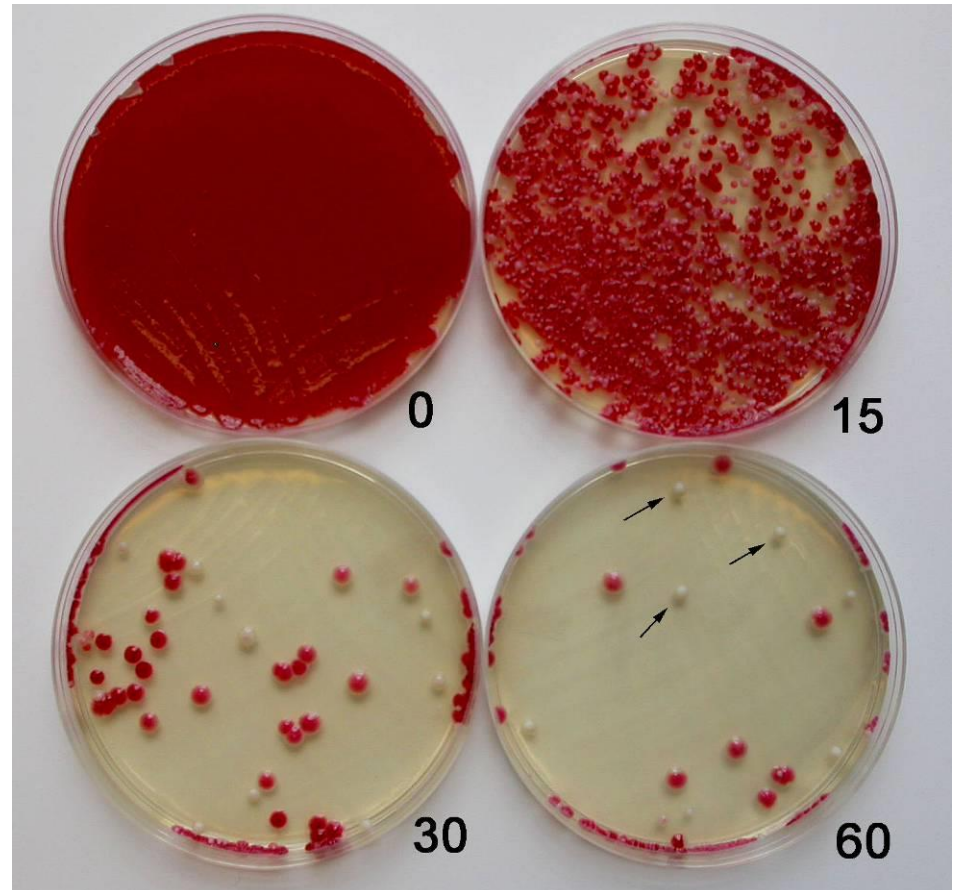


Besugárzás mutagén hatása

Exponencionális 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

A 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.



Hiánymutánsok = auxotróf mutánsok

Olyan mutánsok, amelyek a mutáció következtében elvesztették egy számukra létfontosságú anyag (amino-sav, 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. Az ezt hordozó sejteket szeretnénk azonosítani és szelektálni a hiánymutáció segítségével.

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

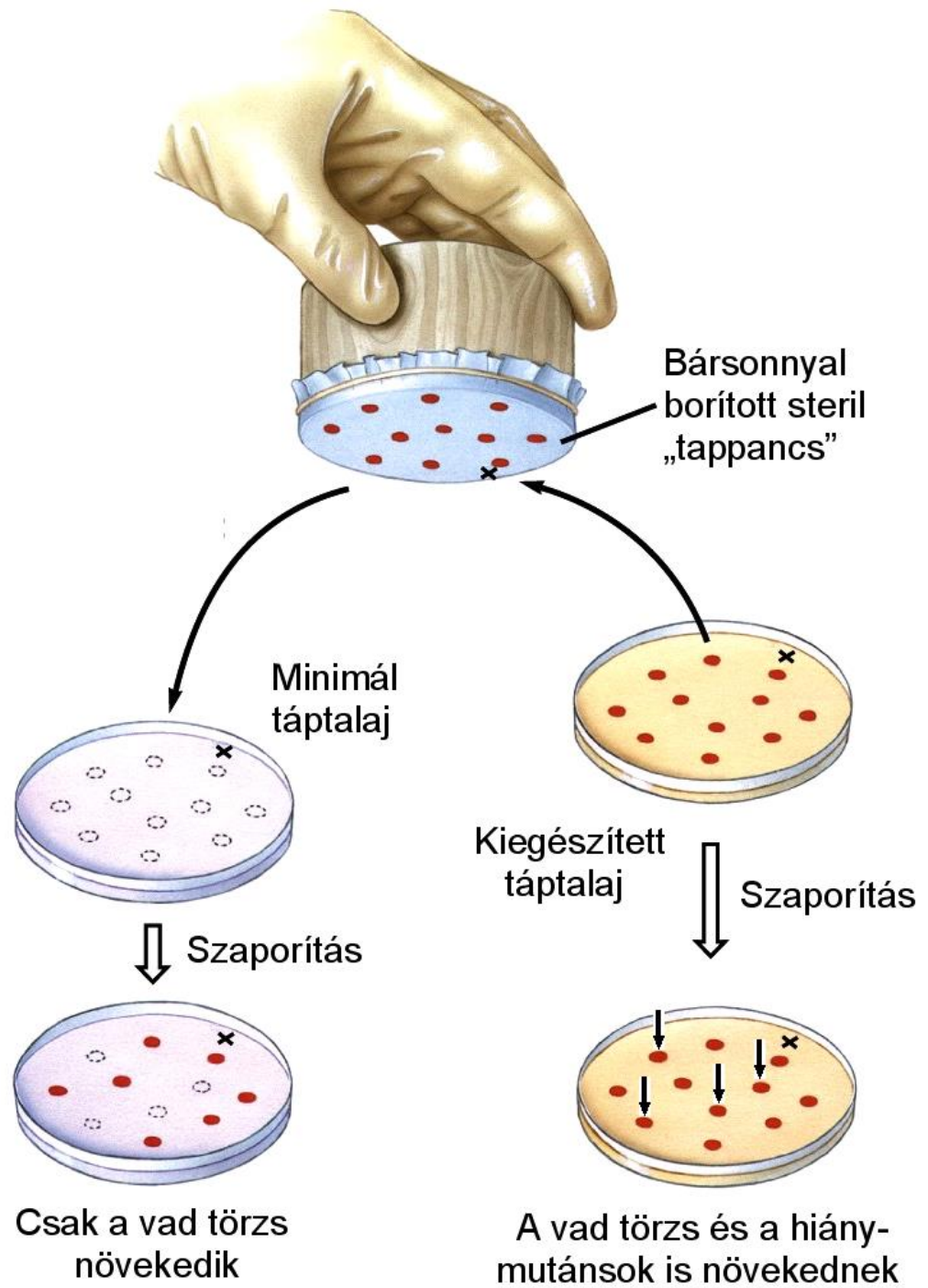
Hiánymutáns (auxotróf): a minimál táptalajon nem növekszik, csak akkor ha azt kiegészítik az igényelt egy (vagy néhány) anyaggal.



Hiánymutánsok izolálása

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.

Emiatt fel tudják borítani a sejtben az anyagcsere szabályozását.

A sejtben a hasonlóság révén egyes enzimeket „be tudnak csapni”, másokat nem. A vad típusú sejtekre mérgező hatással vannak, csak egyes rezisztens mutánsok képesek túlélni az antimetabolitos kezelést.

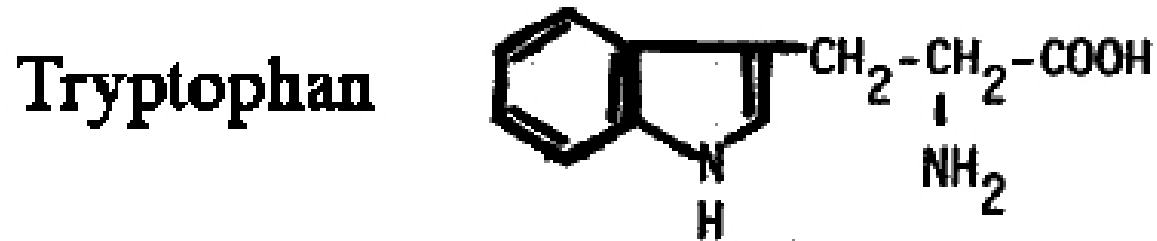
Mit idéz elő egy antimetabolit és miért hasznos nekünk az antimetabolit rezisztencia?

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

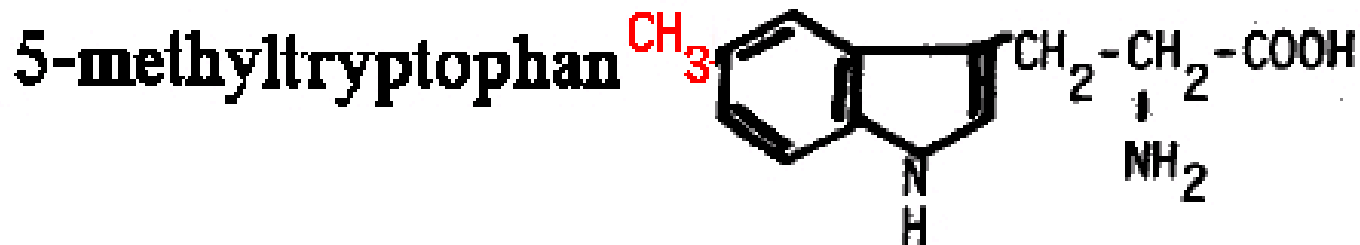
A triptofán és antimetabolitja

Miben különbözik egy antimetabolit a valódi anyagcsere terméktől?

Triptofán – fehérjealkotó aminosav, valódi anyagcsere termék
5-metil-triptofán – antimetabolit, megzavarja a triptofán termelését



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



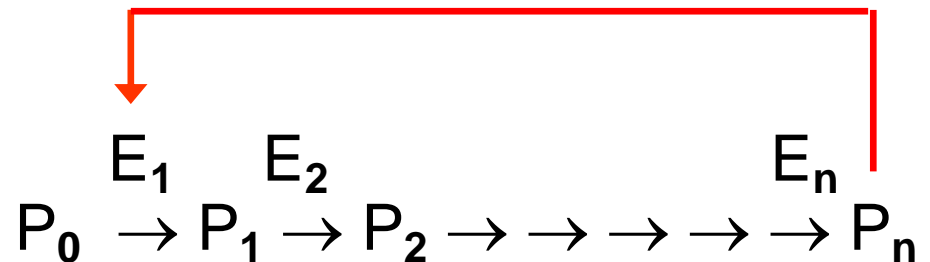
ALLOSZTÉRIKUS SZABÁLYOZÁS

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

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!

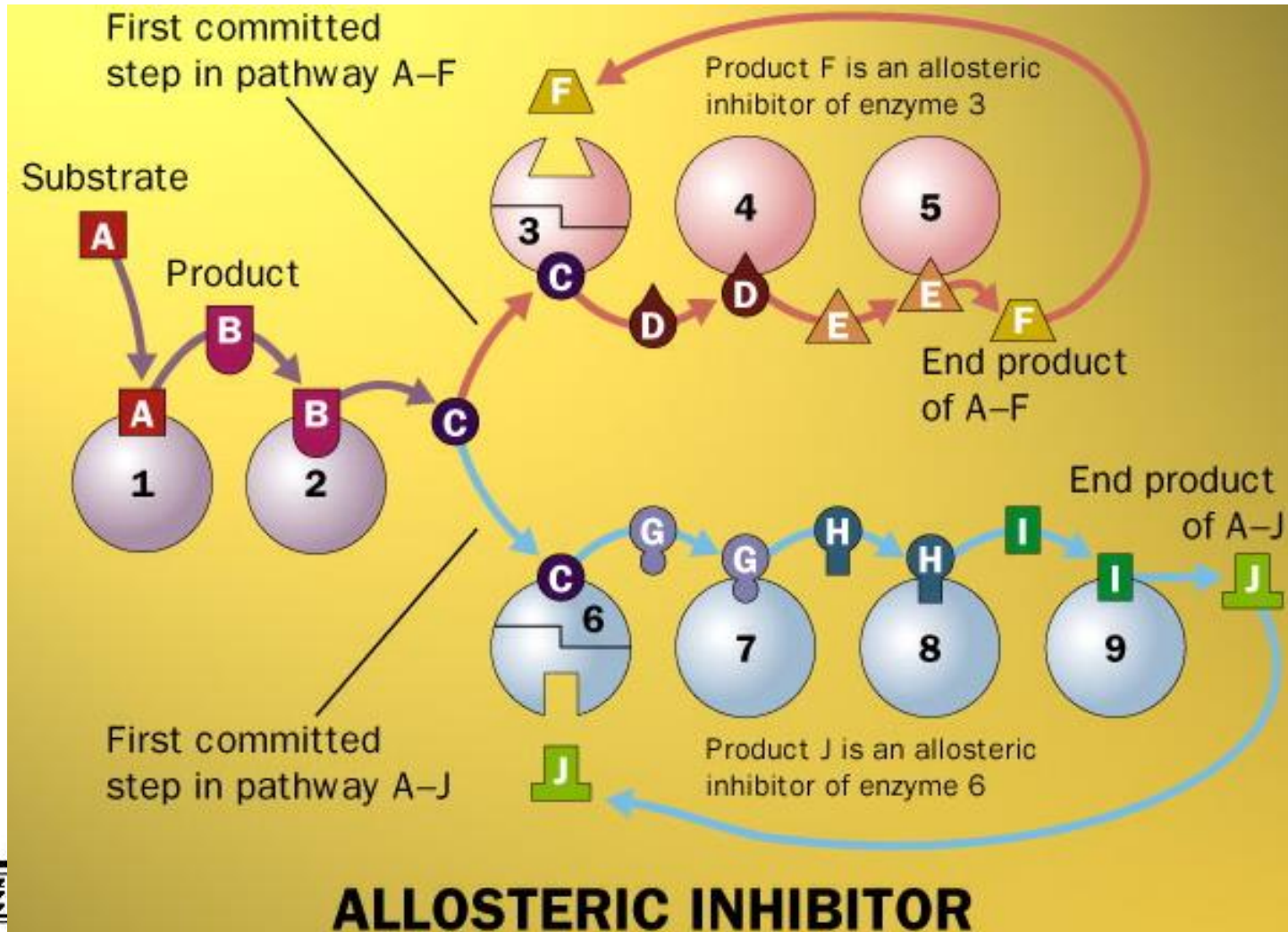
Végtermék-gátlás: egy reakciólánc végterméke visszahat és lefékezi saját termelődését, a legelső enzim működését. (Így a leginkább gazdaságos.)

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?



Allosztérikus és operon szabályozás

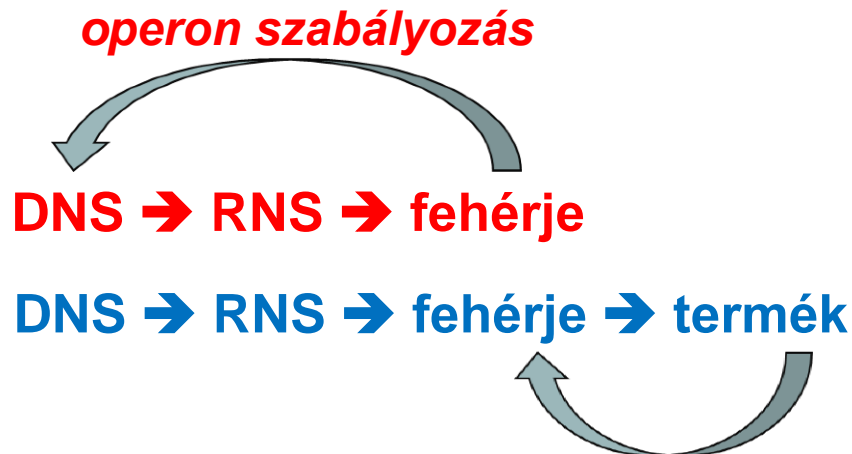
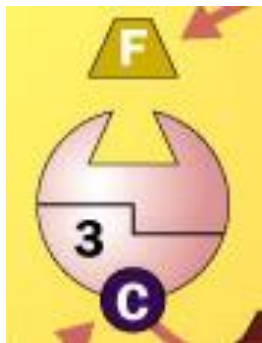
Hasonlóság a kettő között:

- Mindkettő kapcsoló szerű, „két állású” szabályozás
- Mindkettő egy fehérje működésének szabályozására szolgál

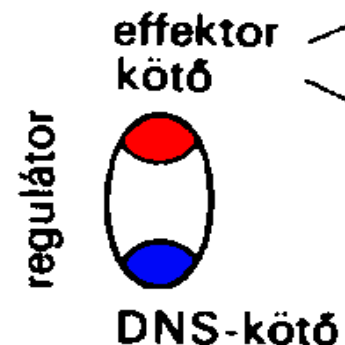
Különbség a kettő között:

- A szabályozott fehérje sejtbeli feladata más
- És így a szabályozás célja, valamint a szintje is más

Allosztérikus szab.



Operon szab.



allosztérikus szabályozás

- Enzim fehérje
- Egy (köztes) anyagcsere terméket állít elő
- Ha szabályozzuk, a termék képződését szabályozzuk

- DNS kötő fehérje
- Semmit sem állít elő
- Ha szabályozzuk, a DNS-en kódolt infó átírását → egy fehérje termelését szabályozzuk

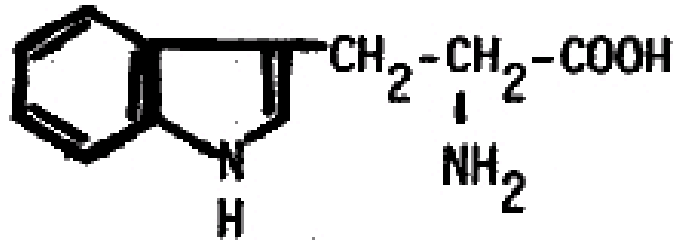
A triptofán és antimetabolitja

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

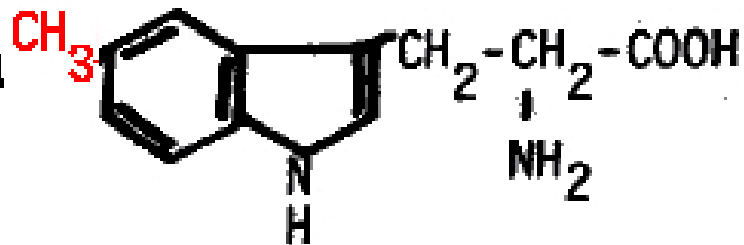
Triptofán – fehérjealkotó aminosav (és szabályozza saját termelését)

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

Tryptophan



5-methyltryptophan



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.



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) →

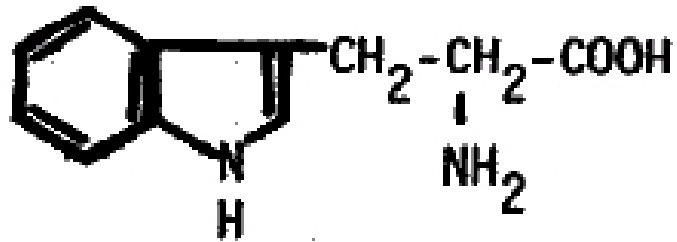


A triptofán és antimetabolitja

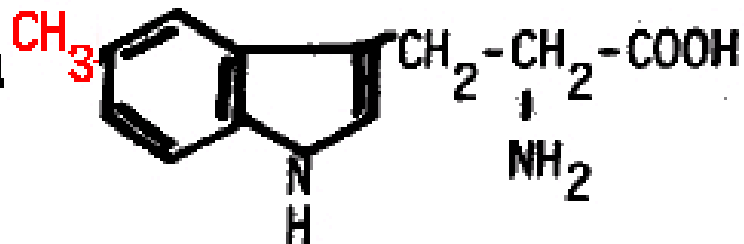
Triptofán – fehérjealkotó aminosav

5-metil-triptofán - antimetabolit

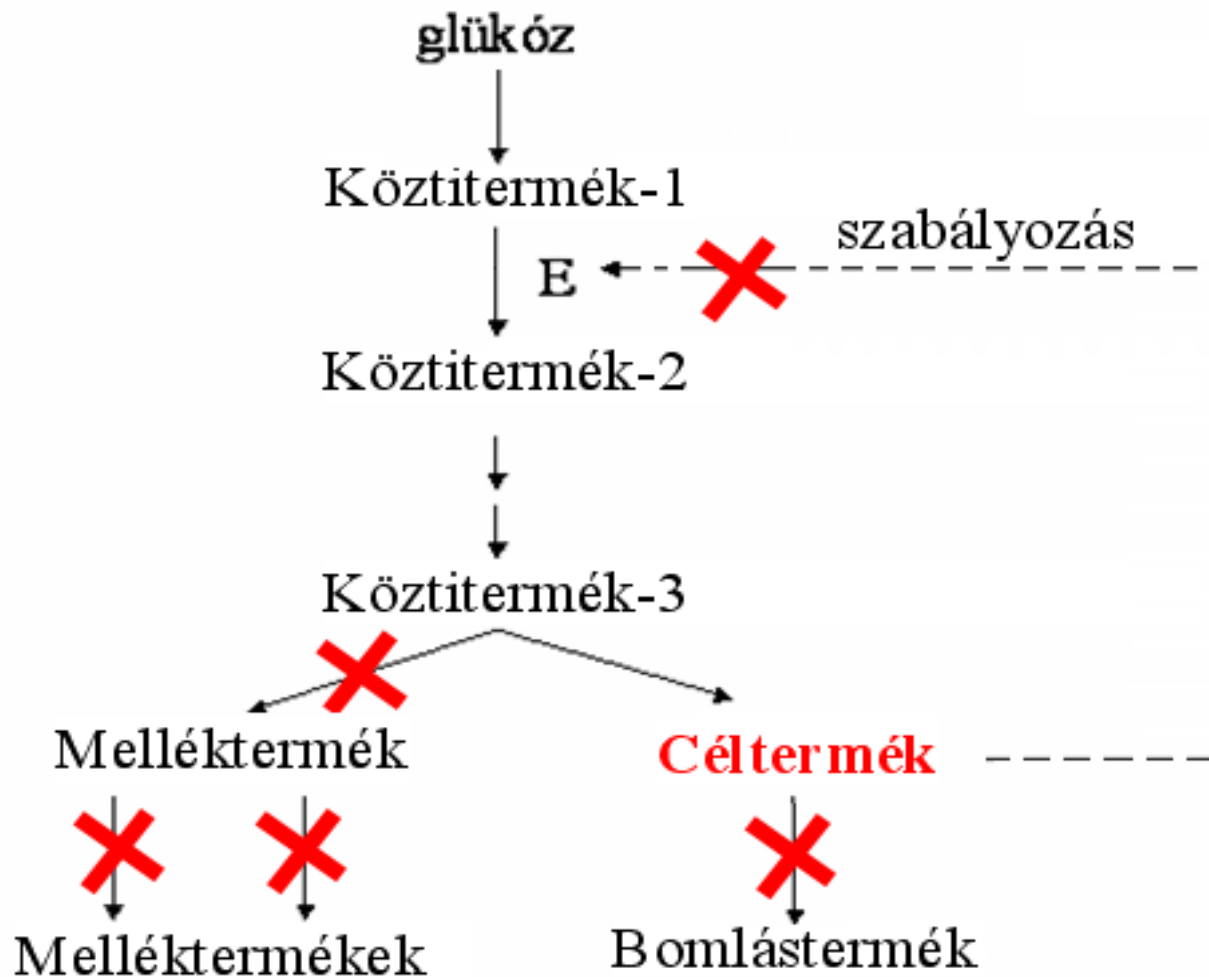
Tryptophan



5-methyltryptophan



Anyagcsere mérnökség – 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).



A TRIPTOFÁN ELŐÁLLÍTÁSA

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

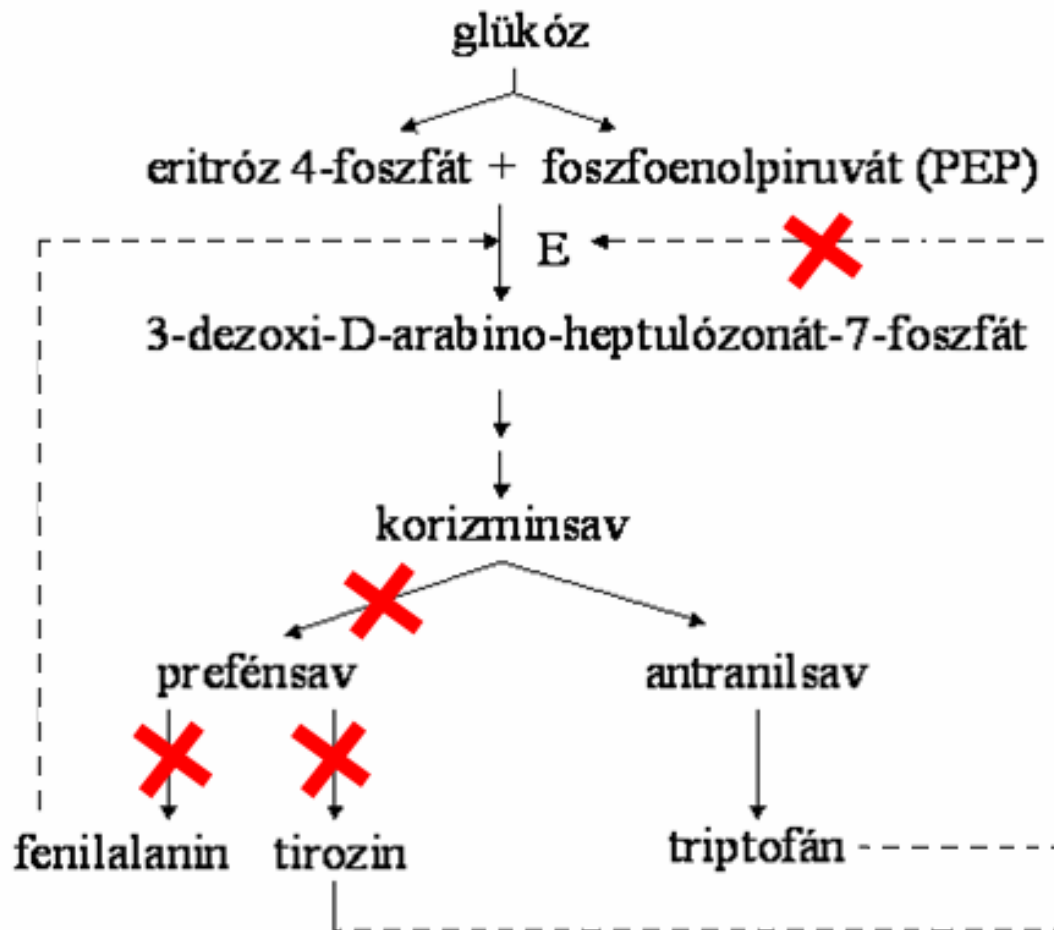
Anyagcsere-mérnöki szelekció:

Auxotrófiák:

Phe⁻, Tyr⁻,

Rezisztencia:

5-Me-Trp^r



Indukált mutáció antibiotikum termelő törzseknél

Az antibiotikumok bioszintézise 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 növénynemesítés és állattenyésztés stratégiájával.)



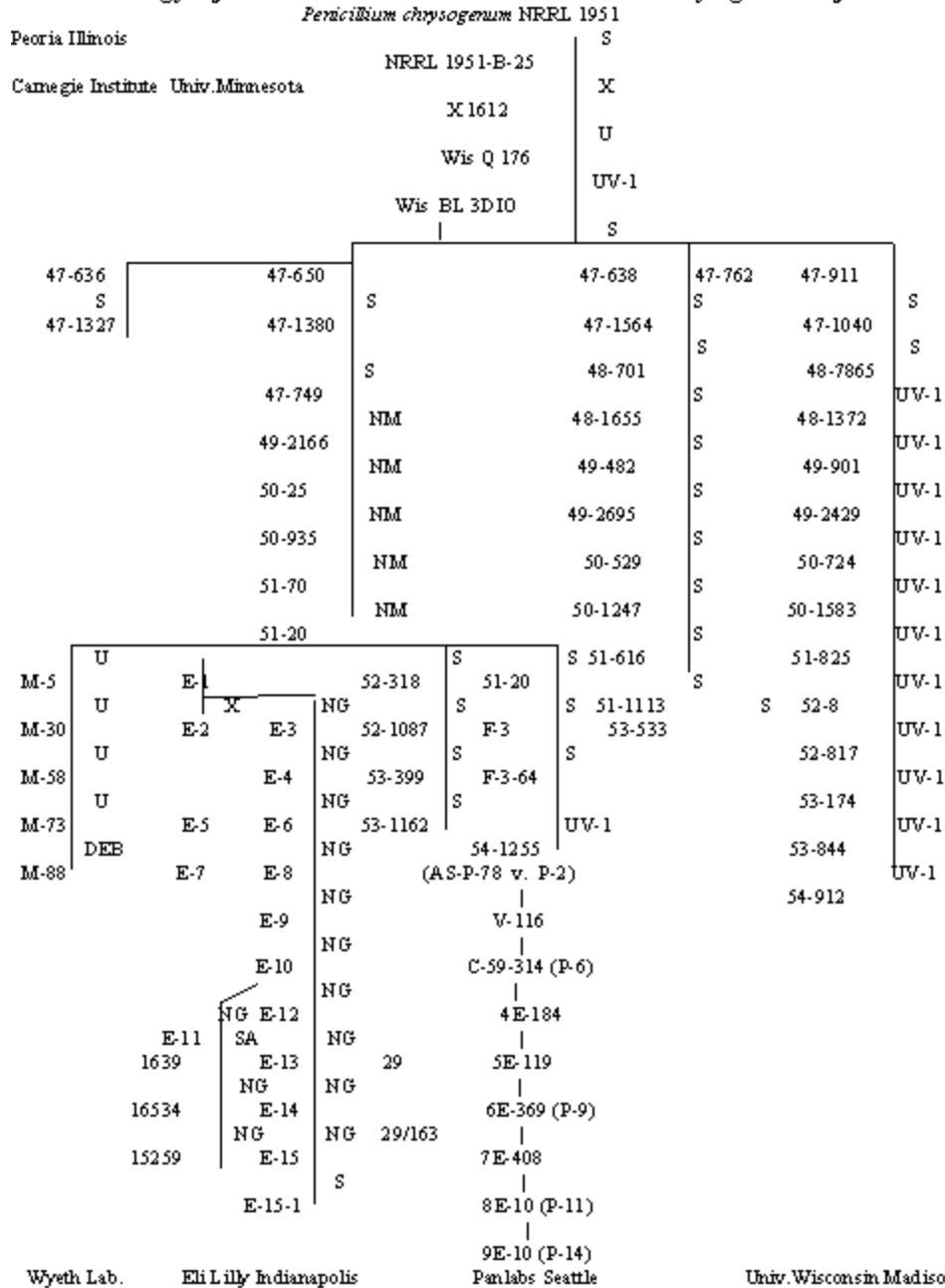
Penicillin termelés fokozása mutációval

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
 Panlabs 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 | | | (AS-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 | | | 4E-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,

M= metil-bis(β -kibretil)amin,

X= röntgenbesugárzás,

NG = nitrozo-guanidin,

UV= ultrahőlyka kezelés,

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.

