

III. 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.



III/1. Indukált mutáció

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

Mutációkat lehet előidézni:

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

Körülmények:

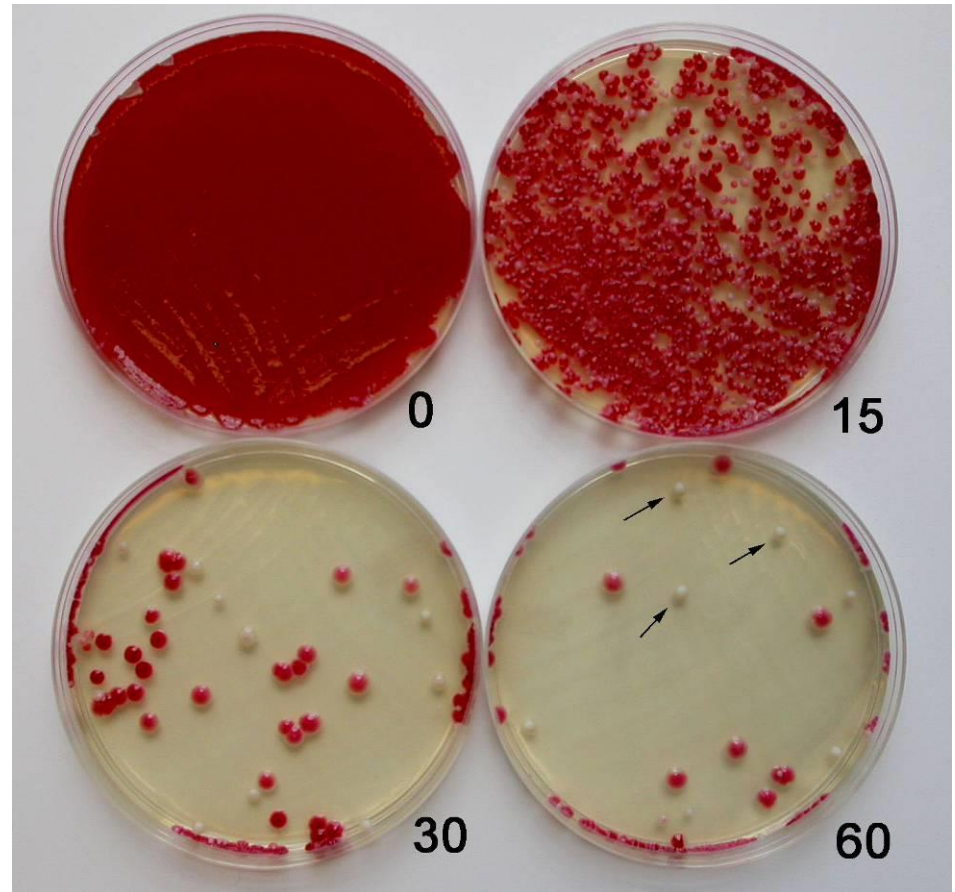
- kezelési idő (expozíció)
- sejtkoncentráció
- tápoldat összetétele



Besugárzás mutagén hatása

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 →

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

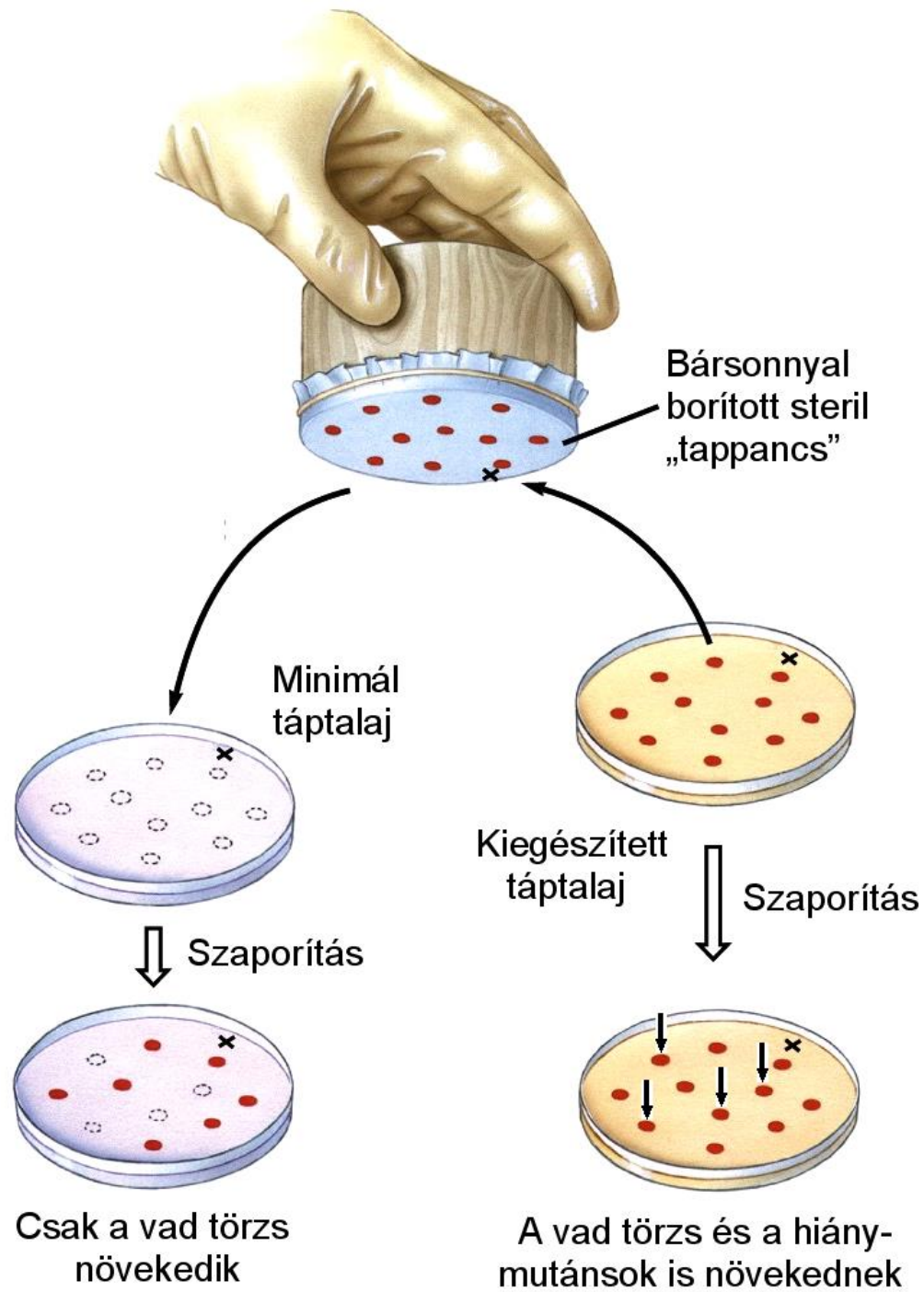
Hiánymutáns (auxotróf): a minimál táptalajon nem növekszik, csak akkor ha azt kiegészítik az igényelt egy (vagy néhány) anyaggal.



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



Antimetabolitok

... olyan vegyületek, amelyek szerkezetükben hasonlítanak egy „valódi” metabolitra. 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.

Ennek jobb megértéséhez idézzük vissza az allosztérikus szabályozás működését.

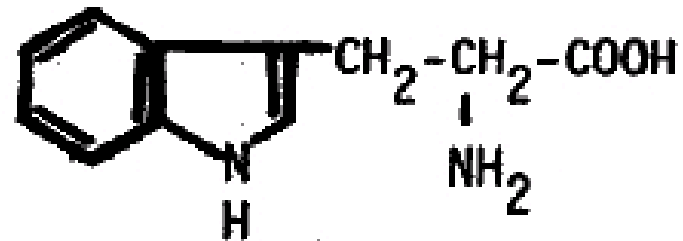


A triptofán és antimetabolitja

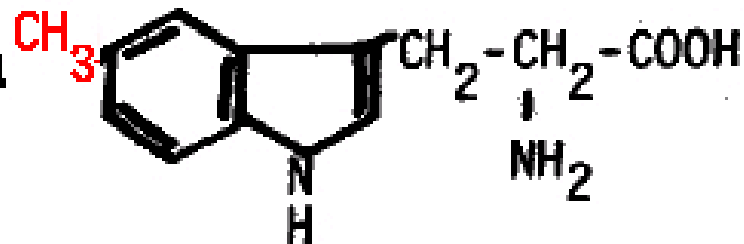
Triptofán – fehérjealkotó aminosav

5-metil-triptofán - antimetabolit

Tryptophan



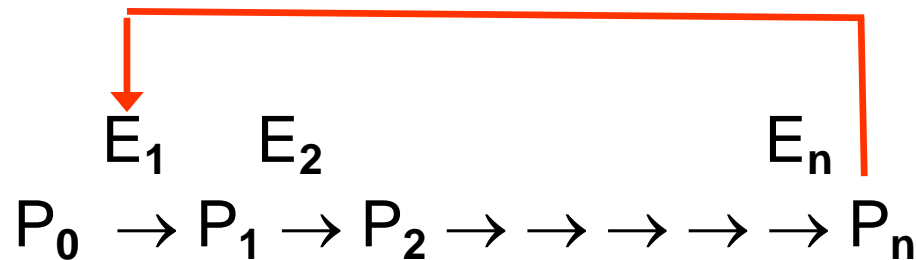
5-methyltryptophan



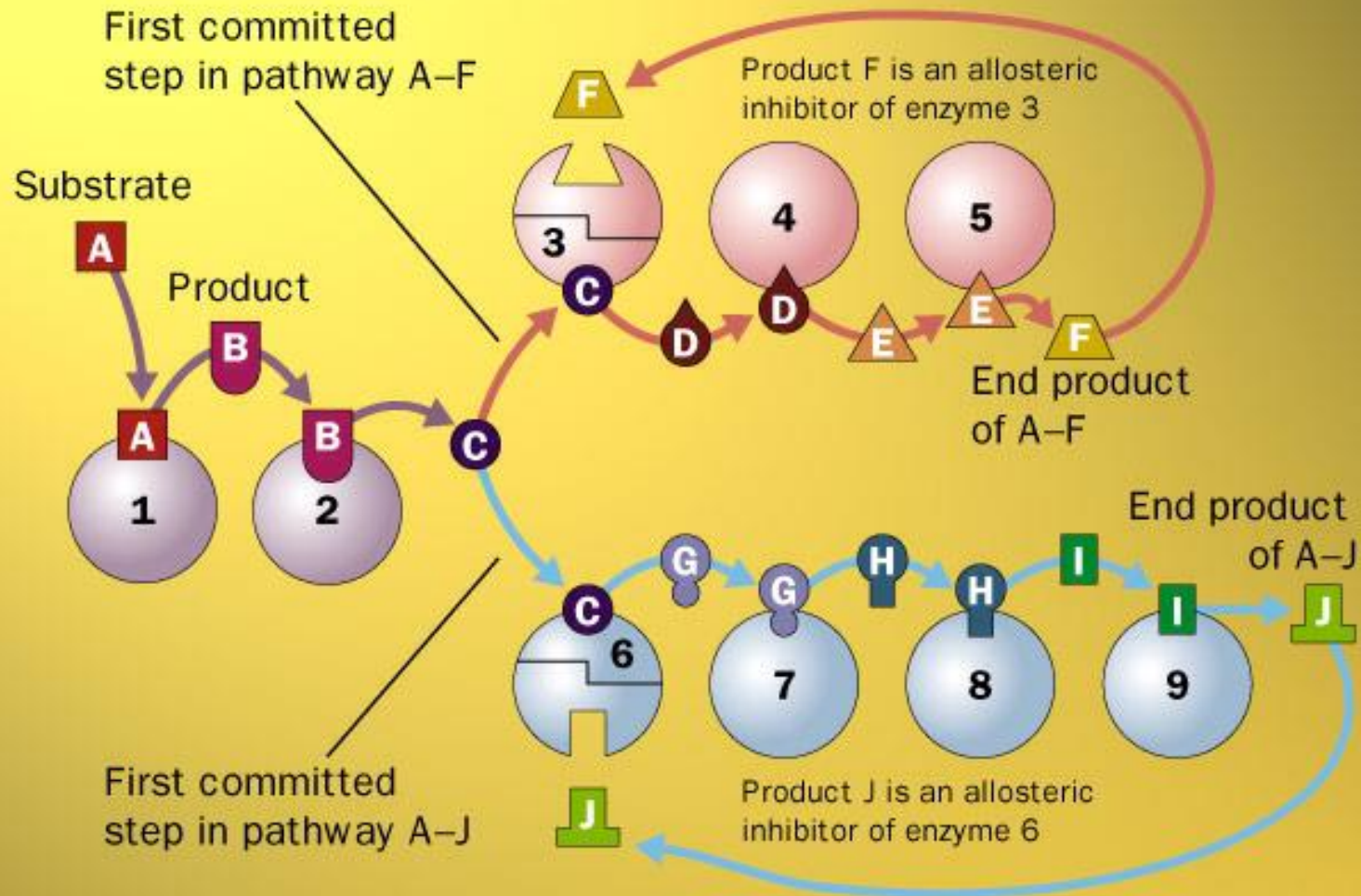
ALLOSZTÉRIKUS SZABÁLYOZÁS

Egyes enzim molekuláknak két, vagy több különböző aktivitású alakja lehetséges. Ezek reverzibilisen átalakulhatnak egymásba. Az „átkapcsolást” egy (vagy több) modulátor molekula kötődése hozza létre (harmadlagos, negyedleges szerkezet megváltoztatása).

Végtermék-gátlás (feed back inhibíció): egy reakciólánc végterméke visszahat és lefékezi saját termelődését, a legelső enzim működését:



Elágazó reakcióláncok szabályozása



ALLOSTERIC INHIBITOR



Antimetabolit rezisztencia

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 élik túl az antimetabolitos kezelést, amelyeknél ez a szabályozó mechanizmus sérült, és a túltermelést nem fékezi semmi.



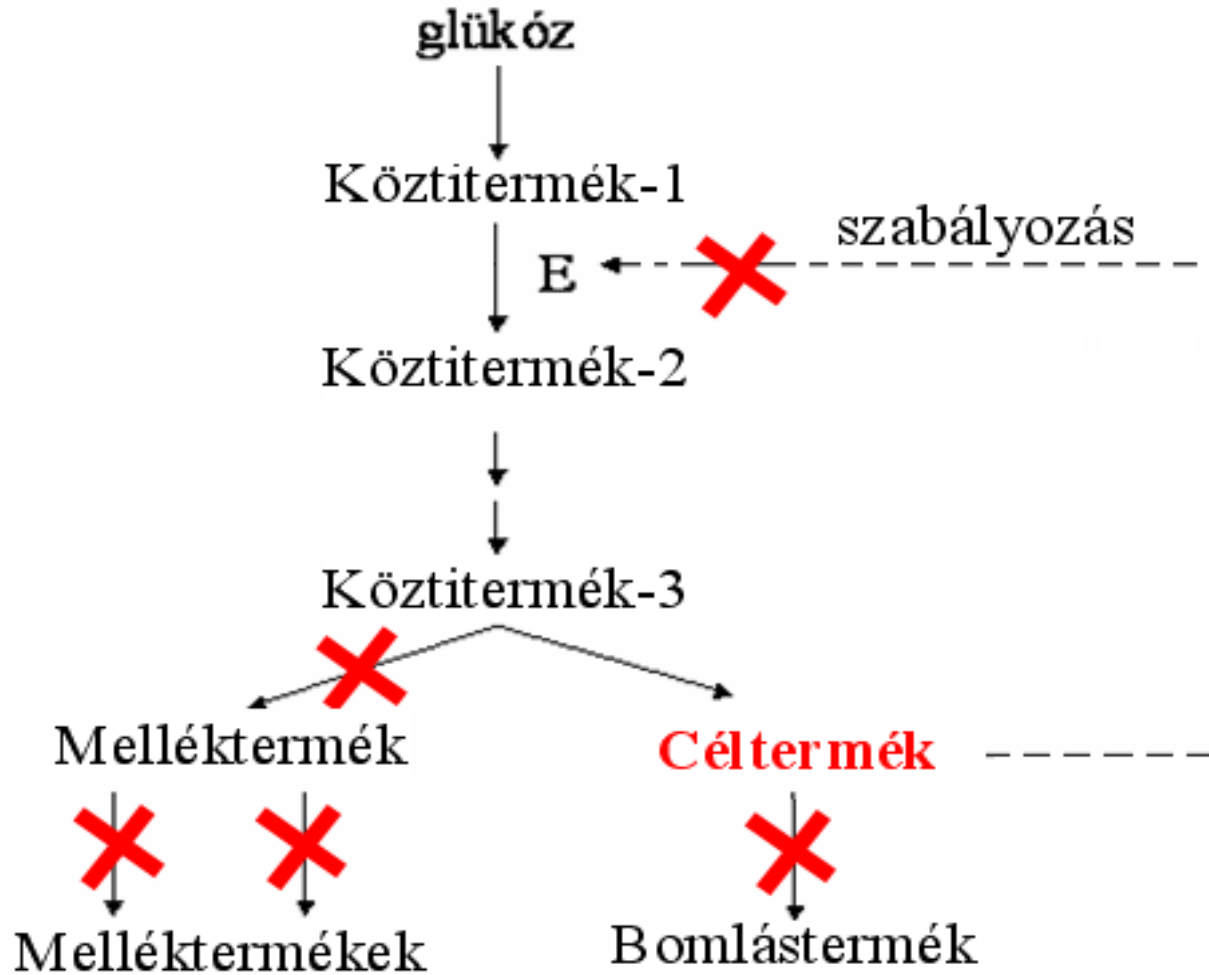
Ipari termelés túltermelő mutánsokkal

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



Anyagcsere mérnökség – metabolic engineering

A primer metabolitok 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 eliminálják.
3. Felfüggesztik a túltermelést megakadályozó mechanizmusokat (antimetabolit rezisztens mutánsok)



A TRIPTOFÁN ELŐÁLLÍTÁSA

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

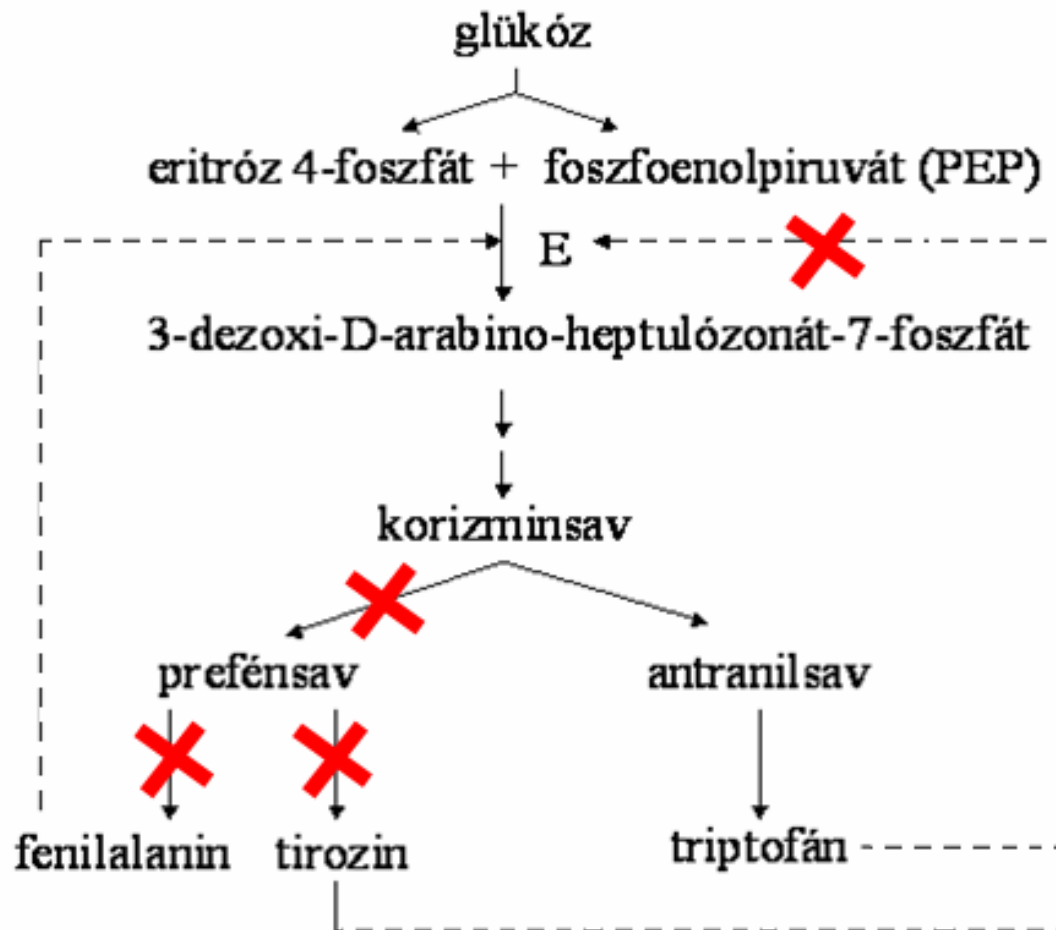
Anyagcsere-mérnöki szelekció:

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, csak a célra, a minél nagyobb antibiotikum termelésre koncentrálunk.

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.



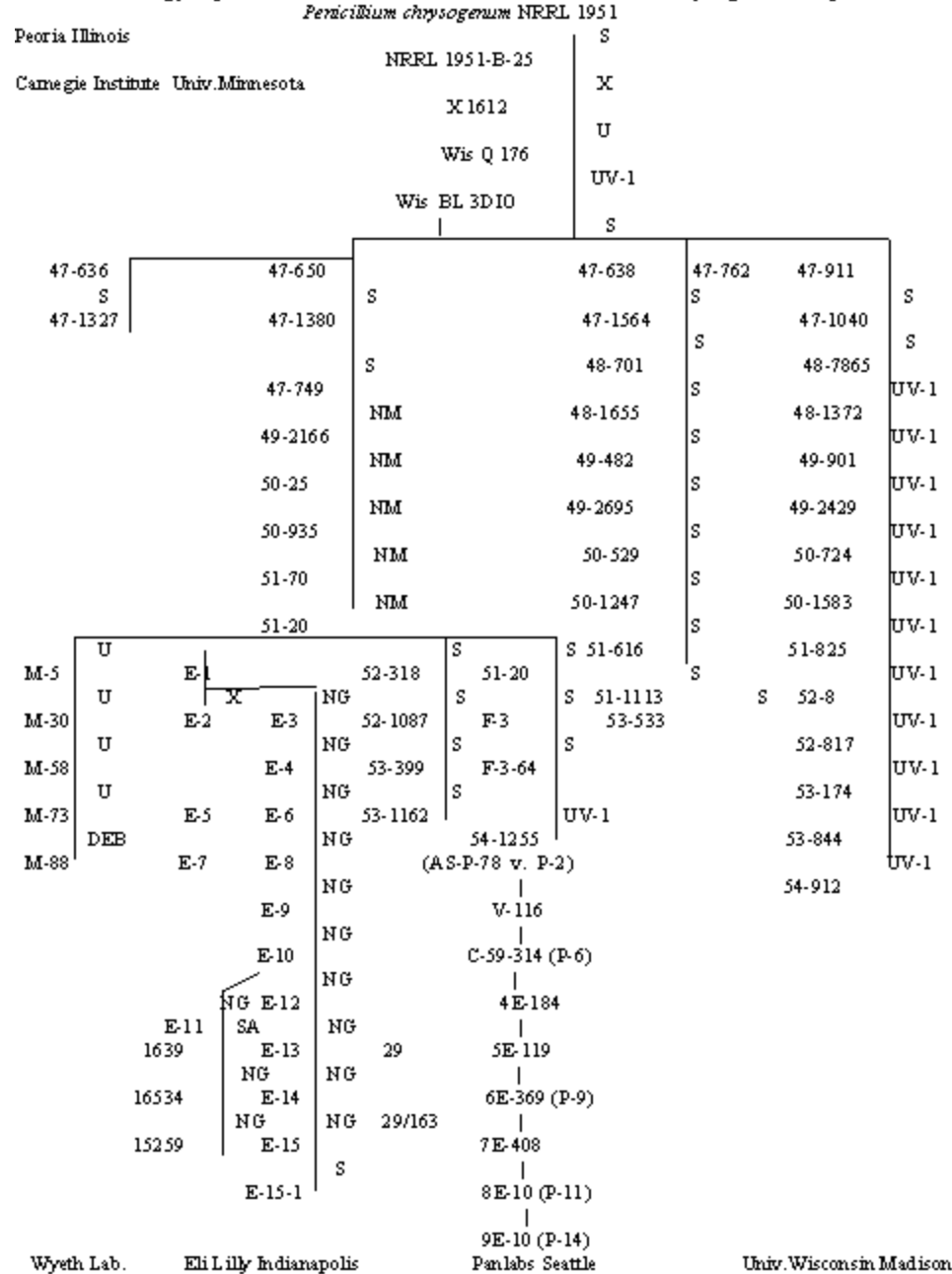
Penicillin termelés fokozása mutációval

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



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= ultrahelyi 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.

