

**7. óra, 2020. március 30.**

**Figyelem: jövő hétfőn, április 6-án 10.15-11.45 között 2. zárthelyi dolgozat írás a Moodle rendszeren keresztül.**

**Sajnos a vegyész karos Moodle-be is be kell ehhez regisztrálnod:**

<https://moodle.ch.bme.hu/login/index.php>

A kurzus jelszót a 2020. 03. 30. esti Neptun üzenetemben találod meg.

A 2. ZH a 4., 5., 6. és 7. (a mai) előadások anyagát öleli fel.

A 7. előadásról szóló szöveges jegyzetben a 86. oldal aljáig jutottunk.

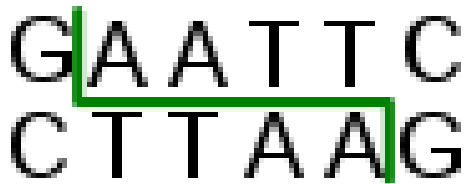
**Nem tananyag**, de ha van időd:

Itt egy **vélemény** arról, hogy miért jó maszkot hordani a jelen helyzetben:

<https://www.facebook.com/photo.php?fbid=10219761598284670&set=a.1650319932103&type=3&theater>

# Hogyan ültethetőek be egy vektorba a tetszésünk szerinti fehérjét kódoló gének? Restriktációs endonukleáz enzimek segítségével.

- A DNS-t speciális felismerési helyeknél elhasítani képes enzimek.
- Baktériumok és archea baktériumok „immunrendszerének” részét képezik.
- A prokariótát ért vírusfertőzés esetén a számukra specifikus DNS szakasznál (szekvencia részletnél) elhasítják a vírus DNS-t.
- A sejt metil csoportokkal jelöli meg a saját DNS-ét.
- A „metilezett” DNS-t a legtöbb restriktációs enzim nem képes elhasítani.



*EcoRI hasítóhely*



*SmaI hasítóhely*

- A hasítóhelyek tükörképi = palindrom szekvenciák.

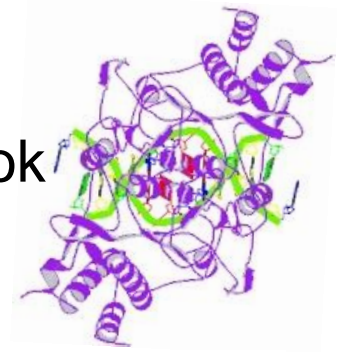




# Restriktíós enzimek

Számunkra molekuláris ollók, a bakteriofágok számára molekuláris piranha-k.

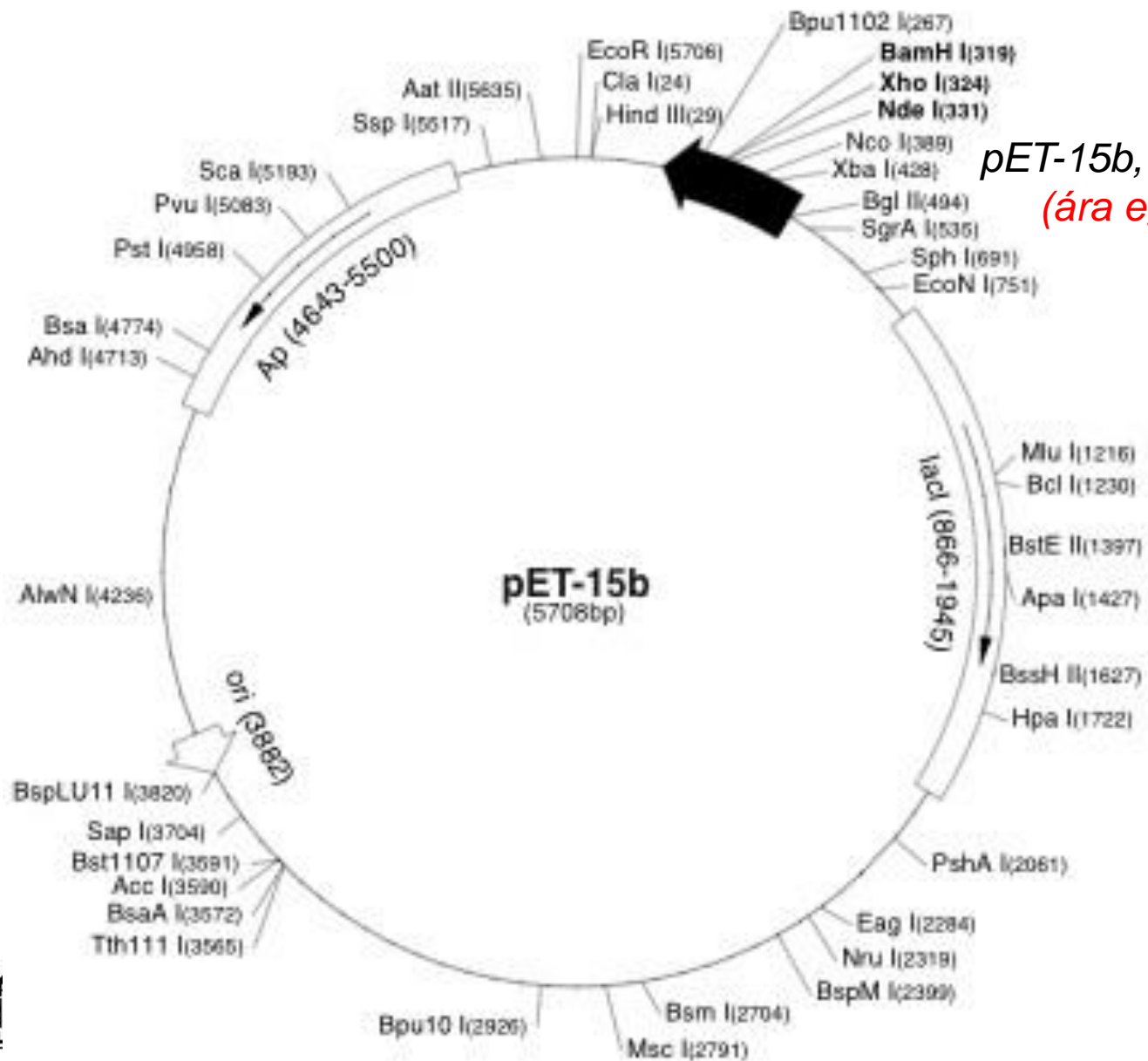
*Nevezéktan és specifitás...*



Mikroorganizmus	Enzim	szekvencia 5' → 3'	Bontási helyek száma			
			λ	Aα 2	SV40	φx174
<i>Arthobacter luteus</i>	AluI	AG↓CT	>50	>50	35	24
<i>Brevibact. albidum</i>	BalI	TGG↓CAA	15	17	0	0
<i>H. aegypticus</i>	HaeIII	GG↓C'C	>50	>50	19	11
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaI	GTT↓AAC	13	6	4	3
<i>Serr. marcescens Sb</i>	SmaI	CCC↓GGG	3	12	0	0
<i>B. amyloliquefaciens H</i>	BamHI	G↓GATC'C	5	3	1	0
<i>E. coli RY13</i>	EcoRI	G↓AA'TTC	5	5	1	0
<i>H. influenzae Rd</i>	HindIII	A'↓AGCTT	6	11	6	0
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaII	C↓C'GG	>50	>50	1	5
<i>K. pneumoniae OK8</i>	KpnI	GGTAC↓C	2	8	1	0
<i>X. holcicola</i>	XhoI	C↓TCGAG	1	6	0	1



# Restriktíós enzim hasítóhelyek egy kereskedelemben kapható plazmidon



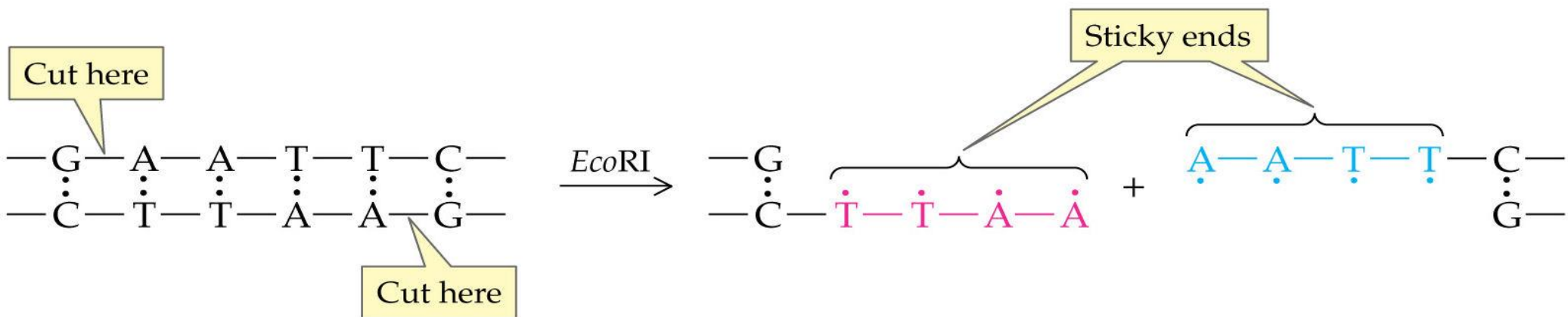
*pET-15b, egy mesterséges plazmid  
(ára egyéni árképzés szerint alakul...)*

# Hogyan vihetők át gének plazmidokkal?

1. Az átvenni kívánt gén izolálása egy sejtből vagy vírustól, vagy megrendelése, ha a kereskedelemben kapható.
2. Beépítés a plazmid DNS-be. „Szabás-varrás” Kell hozzá olló és ragasztó.

„Olló:” enzimek, restrikciós endonukleázok. A kettős szálú DNS-t hasítják, de csak bizonyos helyeken. Tükörképi DNS szakaszoknál (palindrom szekvenciák) „ragadós véget” hoznak létre.

A célgén két végét ugyanazzal az egy vagy két restrikciós enzimmel kell megvágni, mint amivel/amikkel az “üres”, lezárt plazmidot felnyitjuk, hogy a célgén és a plazmid végei egymásba illeszthetők legyenek (“ragadós végek” keletkezzenek). “Össze kell legózni” a célgént a felnyitott plazmiddal.



# Hogyan vihetők át gének plazmidokkal?

3. A célgént hordozó vektor bevitele a gazdasejtbe:

- kémiai és/vagy
- elektromos hatásokkal (vö. a *protoplaszt fúzióval*)

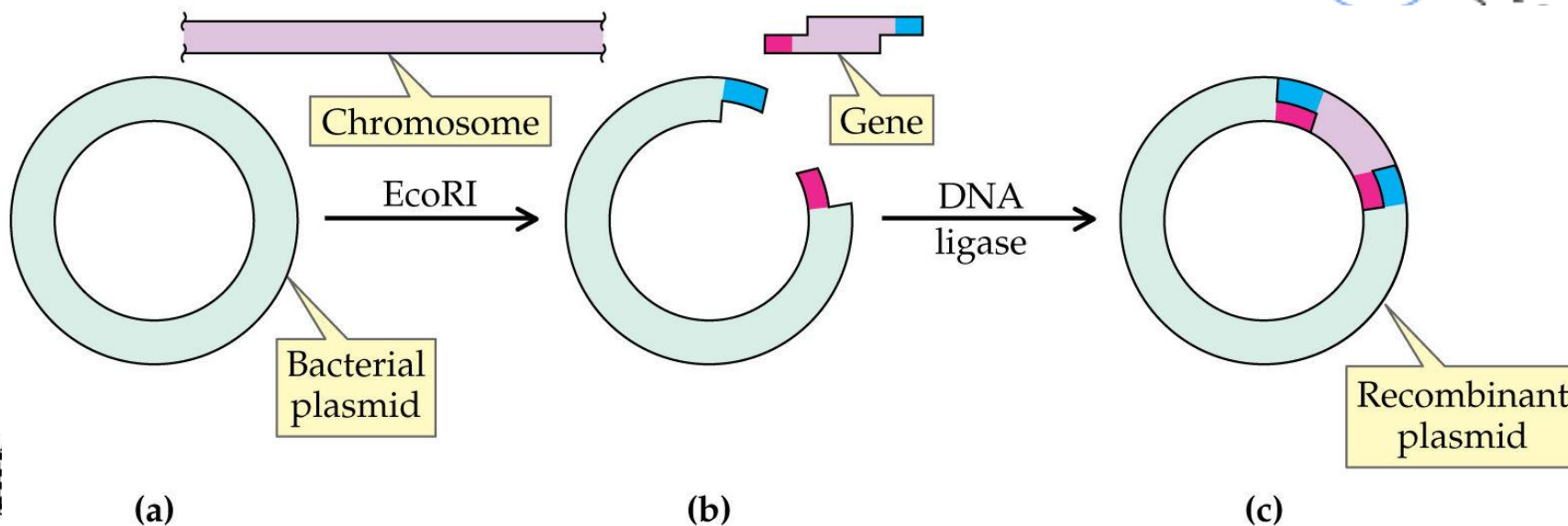
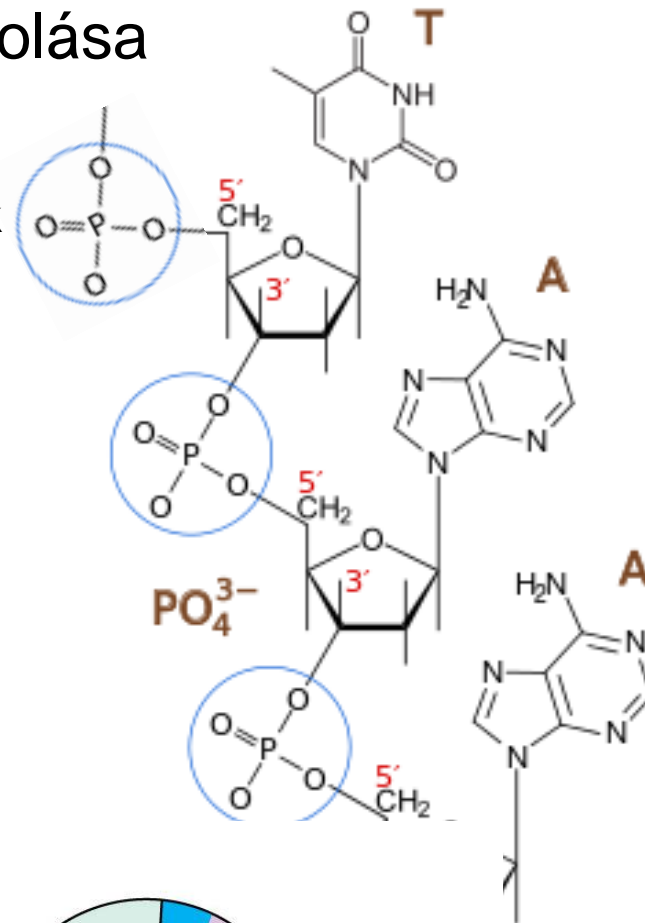
4. Gén kifejeződése + szelekció: a kívánt gén mellé egy marker (nyomjelző) gént is beépítenek (pl. antibiotikum rezisztencia), ami segít kiválasztani azokat a sejteket, ahol megtörtént a beépülés, és „működik” a plazmid. Az adott antibiotikumot tartalmazó táptalajon csak a rezisztencia gént (vagyis az általunk bejuttatott plazmidot) tartalmazó sejtek indulnak növekedésnek.

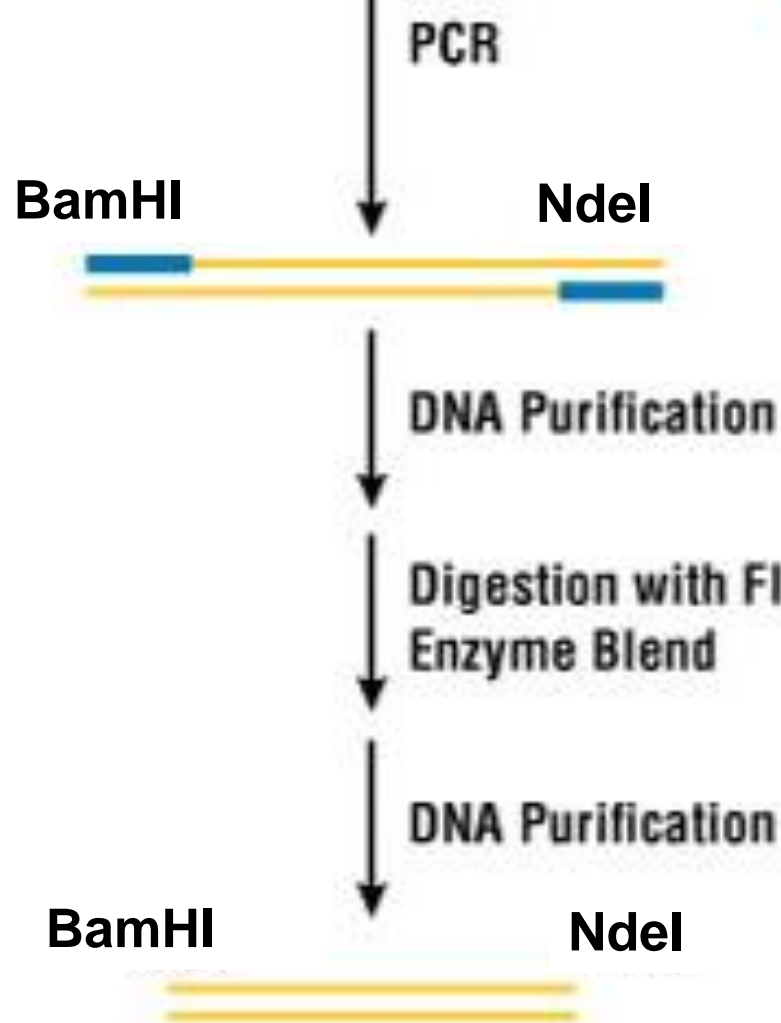
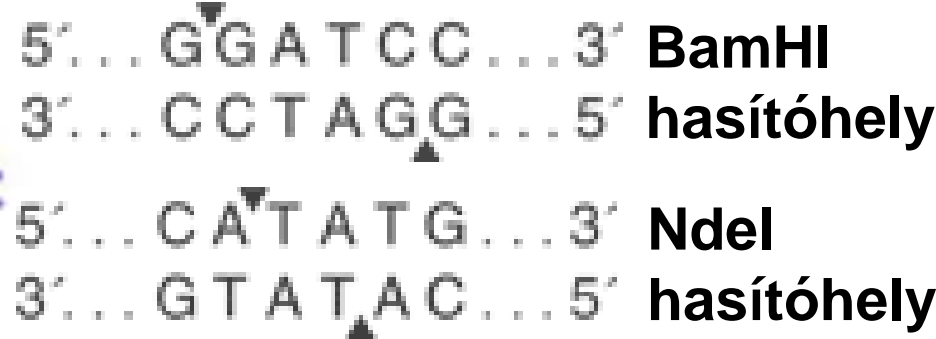
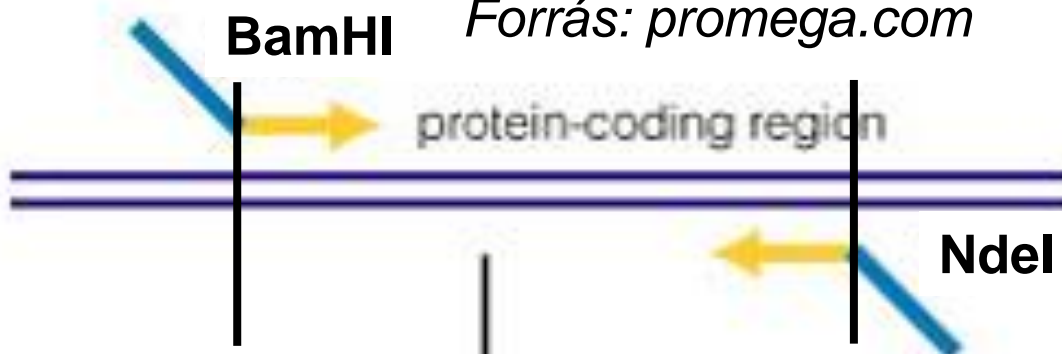
Ez a jelző (marker) gén – például antibiotikum rezisztencia – már benne szokott lenni a kereskedelemben kapható “üres” plazmidban.



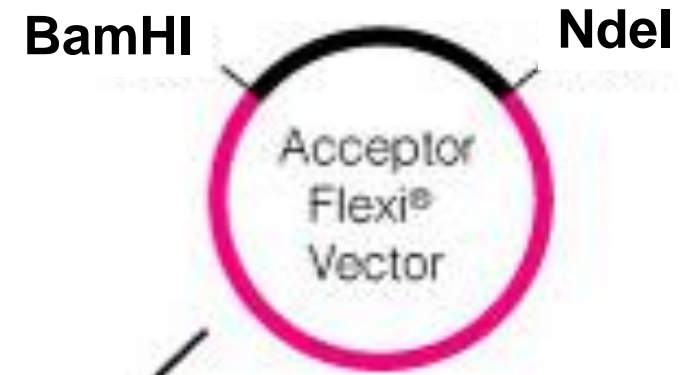
# Ragadós végek készítése és összekapcsolása

- A ragadós végek maguktól is összetapadnak.
- Ez az egymással szembe kerülő komplementer bázisok (A-T és C-G) közötti hidrogén-kötések spontán kialakulását jelenti.
- De a DNS cukor-foszfát alapláncának összekapcsolásához még **kell egy enzim (T4 DNS-ligáz, "ragasztó")**.
- A plazmidba beültetni kívánt DNS szakasz két szélére **PCR reakcióval készíthetünk számunkra megfelelő restrikciós enzim hasító helyeket**.





- A primerek végére restrikciós enzim hasító helyeket tervezünk.
- Ezek „ragadós végekként” fognak szolgálni a vektorba való beillesztéshez.
- A felnyitott vektoron a primerek végeivel komplementer „ragadós végek” lesznek megtalálhatóak, ha ugyanazzal a két restrikciós enzimmel hasítottunk ki belőle egy DNS darabot.
- Azért két restrikciós enzimmel hasítunk, mert így tudjuk megadni a gén beépülésének kívánt vagy helyes irányát.



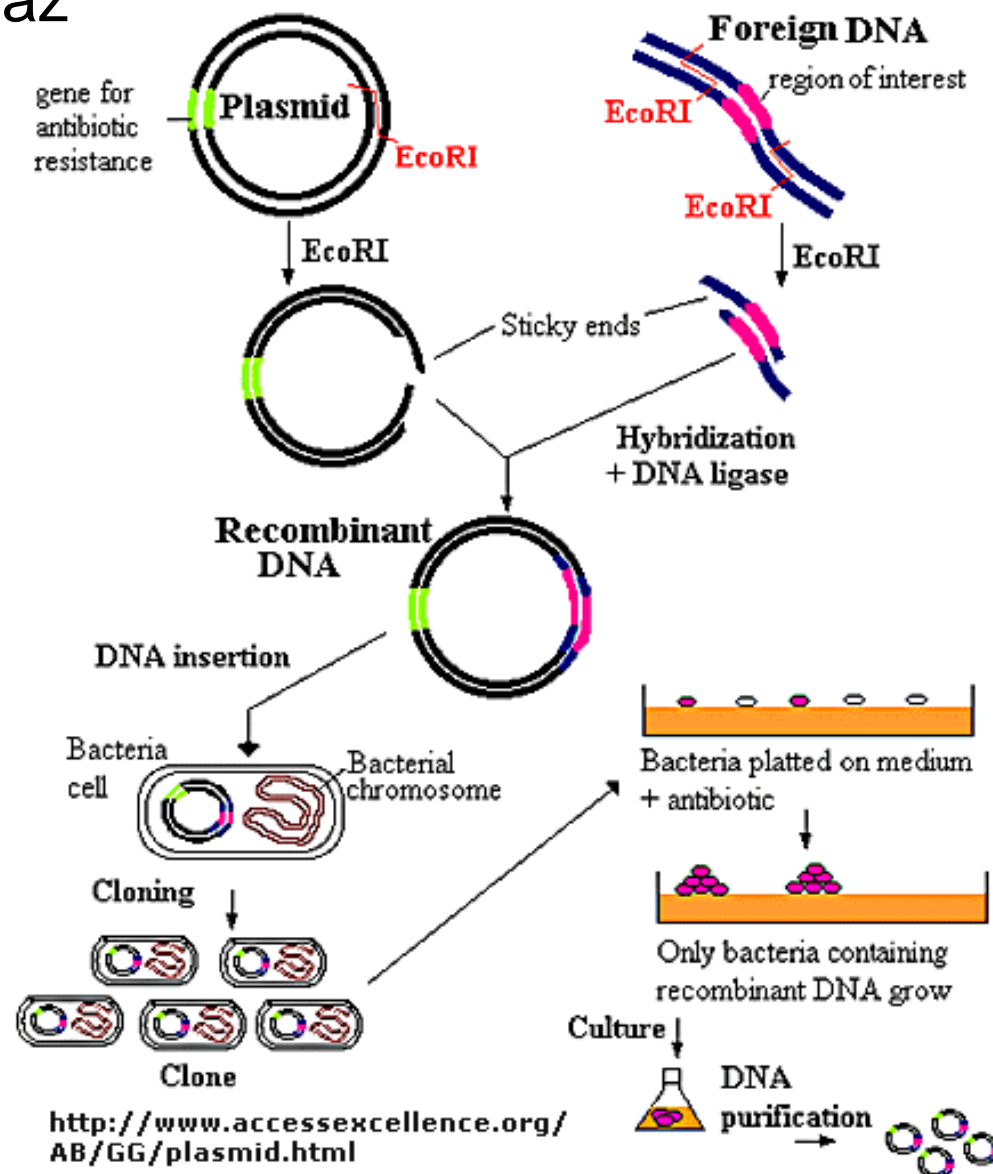


# Idegen DNS sejtbe juttatása – az előbb ismertetett lépések folyamatábrája

Ezzel az eljárással a prokariótákba és eukariótákba is szinte bármilyen gént be lehet vinni.

Cél: fehérjetermelés

- hormonok
- vakcinák
- enzimek
- immunfehérjék
- vérfehérjék

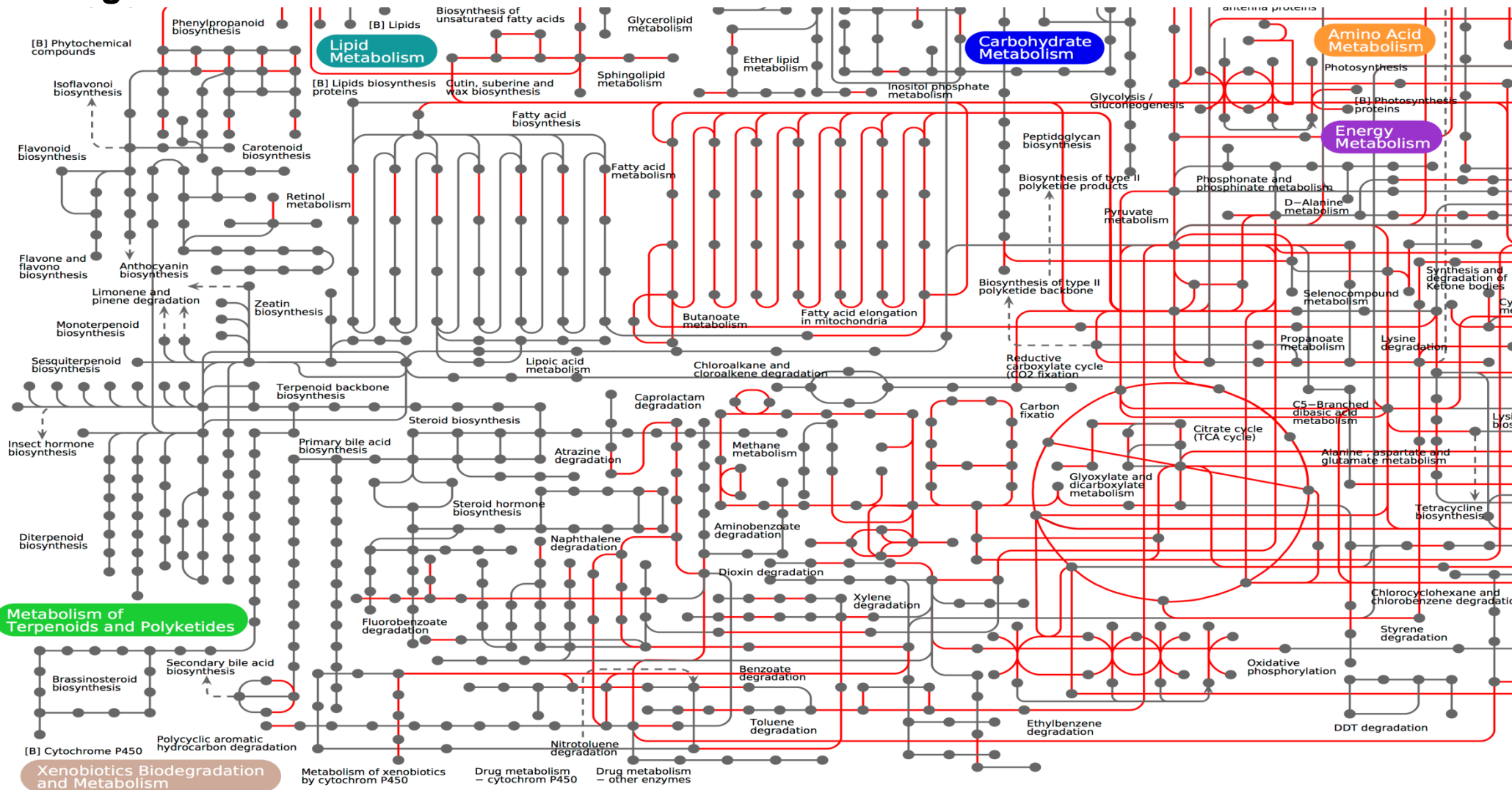


## Cloning into a plasmid



# Ipari termelés génmanipulált mikroorganizmusok felhasználásával

- A biokémiai anyagcsere utak bonyolult reakcióhálózatokat alkotnak.
- Célszerű a biotechnológiai termékeket az anyagcsere jellege szerint megkülönböztetni. ➔



# Élő rendszerek (mikróbák, sejt kultúrák) által előállított termékek csoportosítása az anyagcsere jellege szerint

A biotechnológiai ipar termékei:

- **Elsődleges anyagcsere termékek**  
Amelyek bioszintézise közvetlenül kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez
- **Másodlagos anyagcsere termékek**  
Amelyek bioszintézise nem kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez, csak kedvezőtlen körülmények (pl. tápanyaghiány) hatására indul be. A termék molekulának nincs közvetlen haszna.
- **„Idegen” (rekombináns) fehérjék**, amelyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, máshonnan bevitt gén(ek) termékei. Ezek génjeinek beviteléhez van szükség az előző órán tárgyalt vektorokra (plazmidokra, vírusokra vagy mesterséges kromoszómákra).



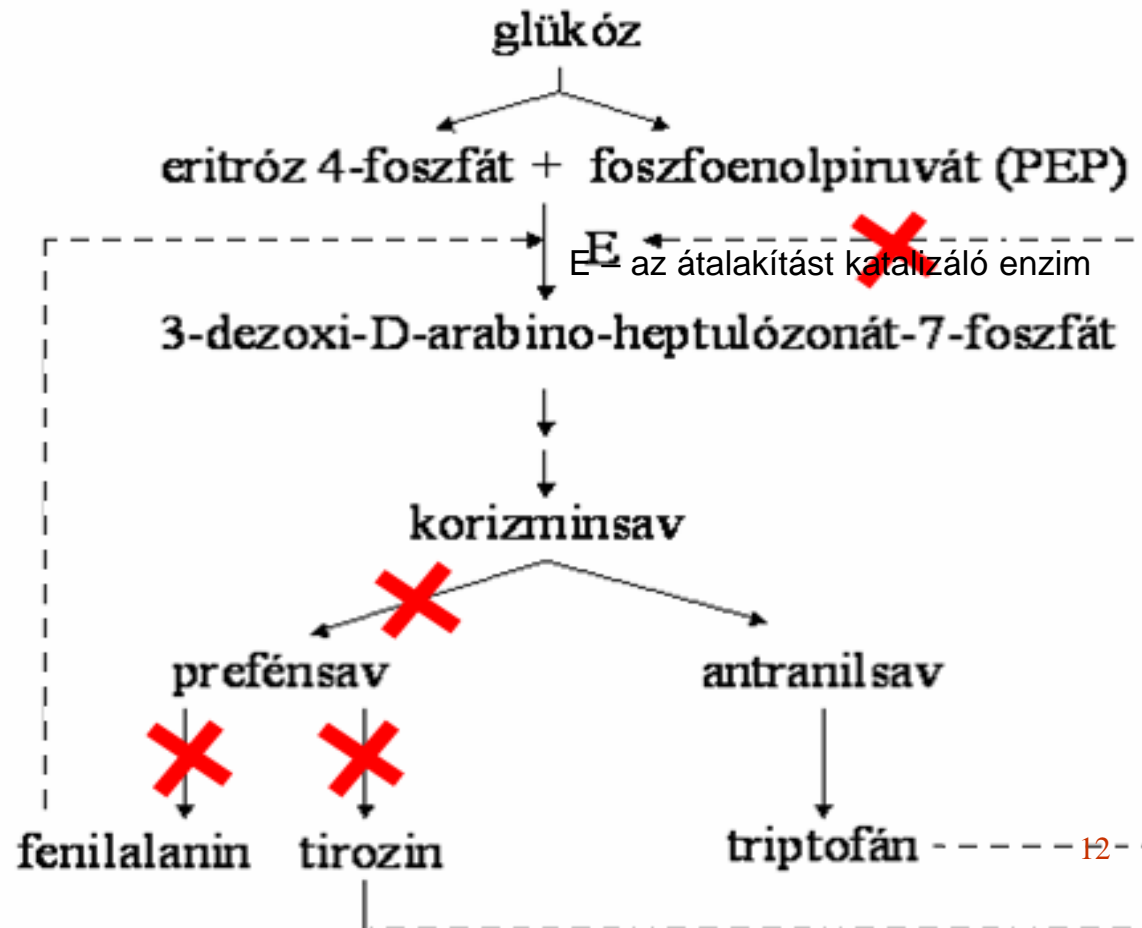
# Elsődleges anyagcseretermékek: pl.: triptofán

*Közvetlenül kapcsolódnak a sejt növekedéséhez vagy energiatermeléséhez. Az elsődleges anyagcsere termékekre magának a mikróbának is szüksége van, csak nem „ipari” mennyiségben.*

Ilyen többek között a sejt által előállított aminosavak, pl. a triptofán bioszintézise. Ez szénhidrátokból történik sok lépéssel. Ha egy mikroba kultúrával elsődleges anyagcseretermékekből ipari mennyiséget szeretnénk előállítani, ahhoz **anyagcsere-mérnöki szelekció** szükséges:

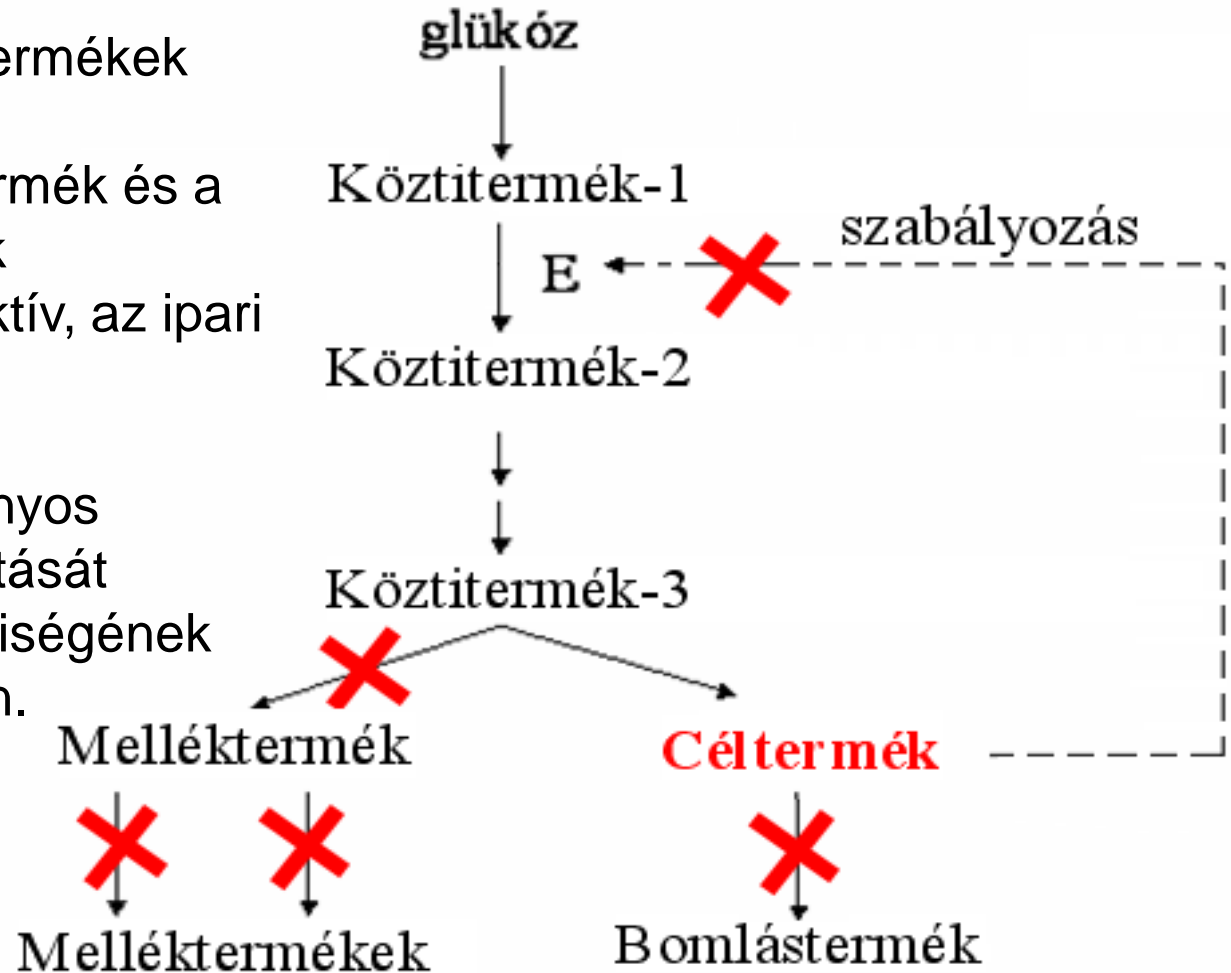
(Japánok oldották meg *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzsekkel.)

Többszörösen ismételt indukált mutációs kezeléssel, majd a triptofán túltermelés szempontjából kedvező mutánsok szelektálásával a triptofánt túltermelő, többszörösen mutáns baktérium törzseket hoztak létre. Ezek **auxotrófiákat** (Phe<sup>-</sup>, Tyr<sup>-</sup>) és a triptofán túltermelés elkerülésére szolgáló sejtszintű szabályozás hiányát tartalmazzák: **rezisztencia** az 5-metil triptofán molekulára (5-Me-Trp<sup>r</sup> mutáció).



# Ismétlés - anyagcsere mérnökség – metabolic engineering

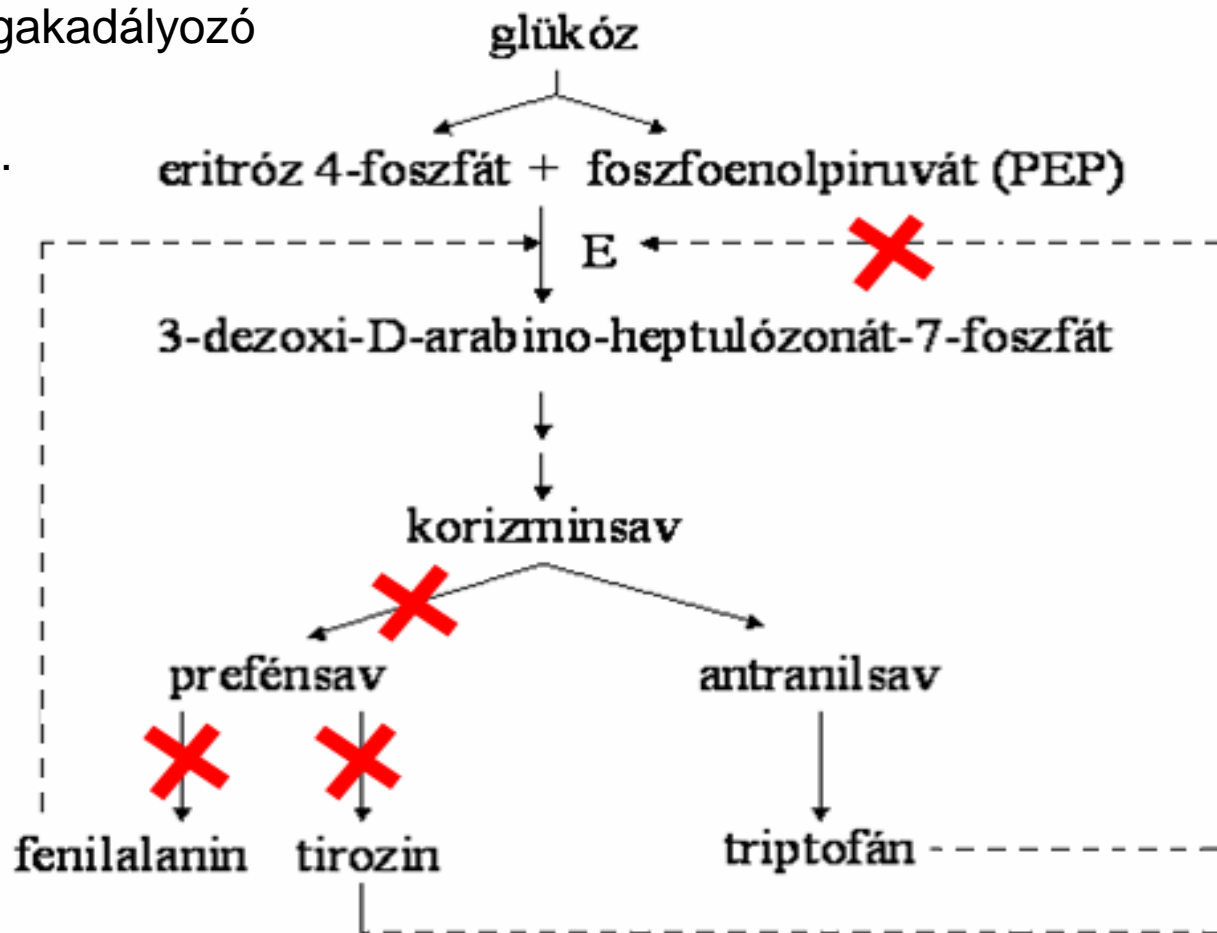
- A mikroba számára a termékek egyformán fontosak.
- A céltermék – melléktermék és a céltermék – bomlástermék megkülönböztetés szubjektív, az ipari folyamat céljait tükrözi.
- A piros áthúzások bizonyos anyagcsere lépések kiiktatását jelölik a **céltermék** mennyiségének maximalizálása érdekében.
- A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



# Ismétlés – az anyagcsere mérnökség három alapelve

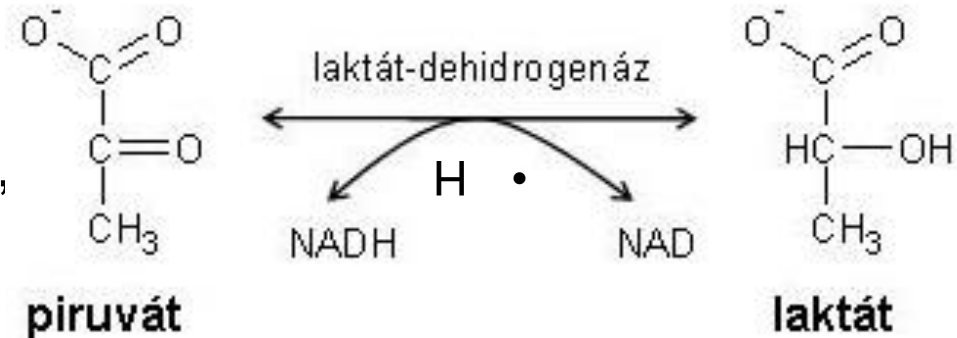
Az elsődleges anyagcsere termékek előállításánál a génállományt úgy változtatják meg, hogy:

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 létrehozása, vagy tápoldat kiegészítés a megoldás.
2. A terméket továbbalakító reakciólépéseket is lezárják.
3. Felfüggesztik a túltermelést megakadályozó mechanizmusokat (antimetabolit rezisztens mutánsok).



# Másodlagos anyagcsere termékek

- Termelődésük nem kapcsolódik közvetlenül a sejt energiatermeléséhez, növekedéséhez vagy szaporodásához, hanem
- csak **kedvezőtlen körülmények hatására** indul be.
- Sokszor nem is a termék a fontos a sejt számára, hanem a kiindulási anyag, amitől meg “szeretne” szabadulni .



*Példa az emberi sejteknél: tejsav termelés megfeszített izommunka mellett.*

*A tejsav azért képződik, mert oxigén (O<sub>2</sub>) hiányában a sejt nem képes megfelelő mennyiségben a mitokondrium elektron transzport láncának átadni az elektronokat, így ezek ideiglenesen ebben a formában „tárolódnak”.*



# Másodlagos anyagcsere-termékek: például színanyagok vagy antibiotikumok

*Az antibiotikumok bizonyos fokig hasznosak a sejt számára, de ezek sem termelődnek „fölöslegesen”, a mikroba számára optimális élethelyzetben.*

**Antibiotikumok:** mikroorganizmusok által termelt olyan másodlagos anyagcsere termékek (szekunder metabolitok), melyek más mikroorganizmusokat elpusztítanak vagy gátolják fejlődésüket.

Alkalmazásuk:

Humán gyógyászat: mikrobiális fertőzések gyógyítására (a hatékony koncentrációban az emberi szervezetet ne károsítsa)

Rákellenes antibiotikumok: citosztatikus (a sejtosztódást gátló) hatásúak, a kemoterápia eszközei.

Állatgyógyászat

Állattenyésztésben: takarmány adalékként



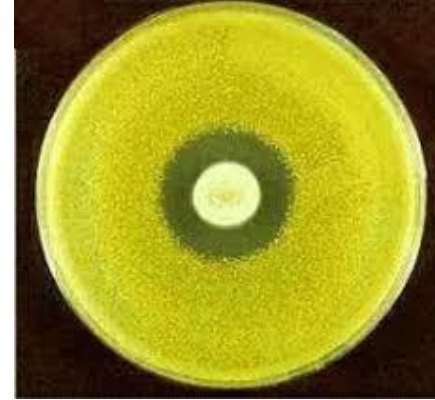
<http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html>





# Egy kis történelem

**Fermentáció:** szerves (táp)anyagok enzimekkel vagy mikróbákkal történő átalakítása.



- 1889 - antibiózis ↔ szimbiózis (Viullemín)
- 1912 - Salvarsan, szerves arzén származék, vérbaj ellen, (Ehrlich-Hata, eleinte káros hatás a központi idegrendszerre)
- 1936 - Szulfonamidok (p-amino-szulfonsav-amidok), Domagk
- 1929 - penicillin észlelése, Fleming
- 1944 - a penicillin ipari gyártása (hadi anyag)
- 1944 - 1960 új antibiotikumok felfedezésének korszaka
- 1950 - félszintetikus származékok (**fermentáció** után kémiai reakció)
- 1990 - nincsenek új molekulák, a **szabadalmak** lejártak → generikus terméké váltak, verseny a piacon.

**Gyógyszeripari szabadalom:** 20 vagy 25 év egy hatóanyagra.

**Originális** vs. **generikus** készítmények.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

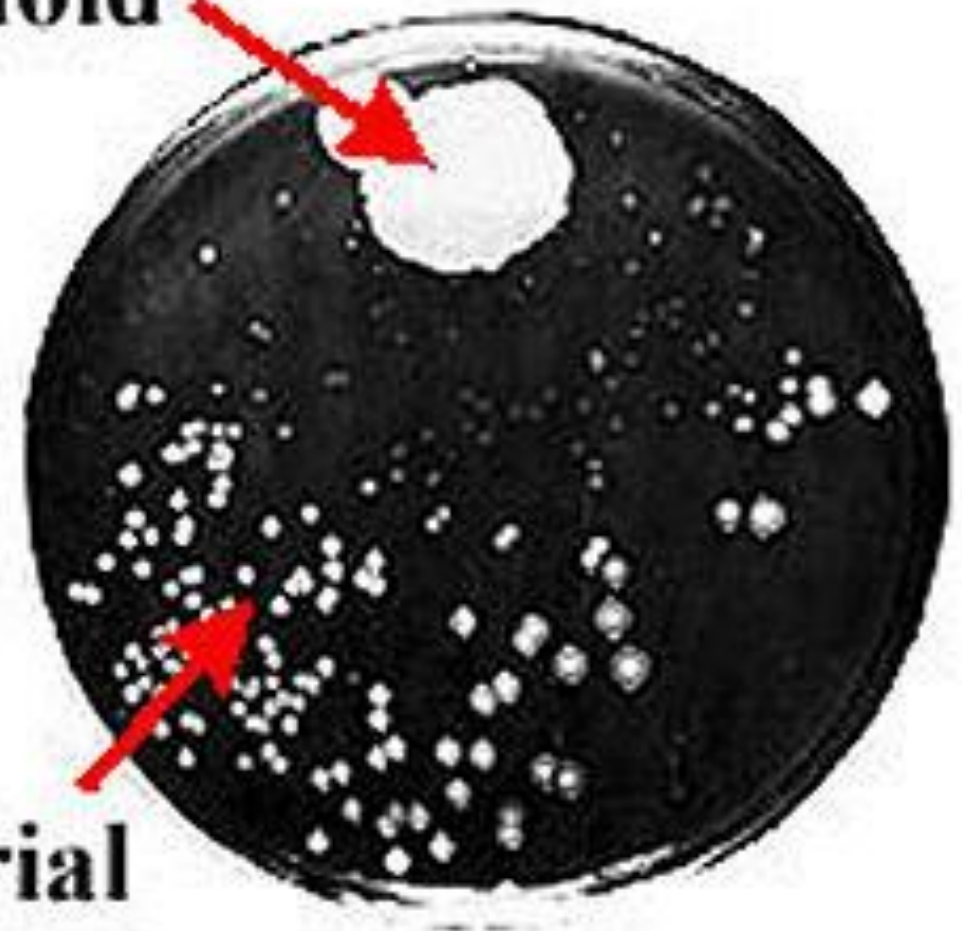


# *Fleming's original plate:*

A

1929 A. Fleming, k  
Izolálás, tisztítás, sze  
1940 hadianyaggá v  
1943 klinikai kipróbál  
*Penicillium chrysoge*  
1944 2,5 tonna  
szubmerz tenyészet,  
1946 32 tonna  
1952 Magyarországo  
1980 kb. 30.000 tonn  
2000 ~ 100.000 tonn

**mold**



**bacterial  
colonies**



BME

# Antibiotikumok

*Miért kevés az új antibiotikus molekula?*

Az elmúlt 80 évben kb. 12-13 ezer antibiotikumot fedeztek fel. A humán gyógyszer piacon ebből ~2-300 molekula van. Ennek ~10 %-át gyártják tisztán fermentációs úton, ~80 %-ot fermentációval és utána kémiai módosítással (= félszintetikus). A maradékot tisztán kémiai szintézissel (olcsóbb).

Miért ilyen kevés?

- toxicitás
- nem elég hatásos, van nála jobb
- mellékhatások
- rezisztencia

**Rezisztencia:** lehet állandó vagy szerzett (pl. plazmid felvételével vagy bakteriofág fertőzéssel).

Vannak **multirezisztens törzsek** is (pl. *M. tuberculosis*, *S. aureus*)



# Példa: penicillin (csoport)

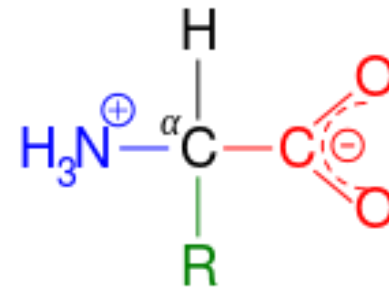
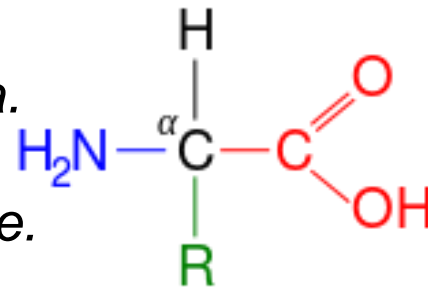
①

②

Jobbra: aminosavak általános szerkezete.

Forrás: Tim Vickers, Yassine Mrabet, Wikipedia.

Lent: 6-aminopenicillánsav általános szerkezete.



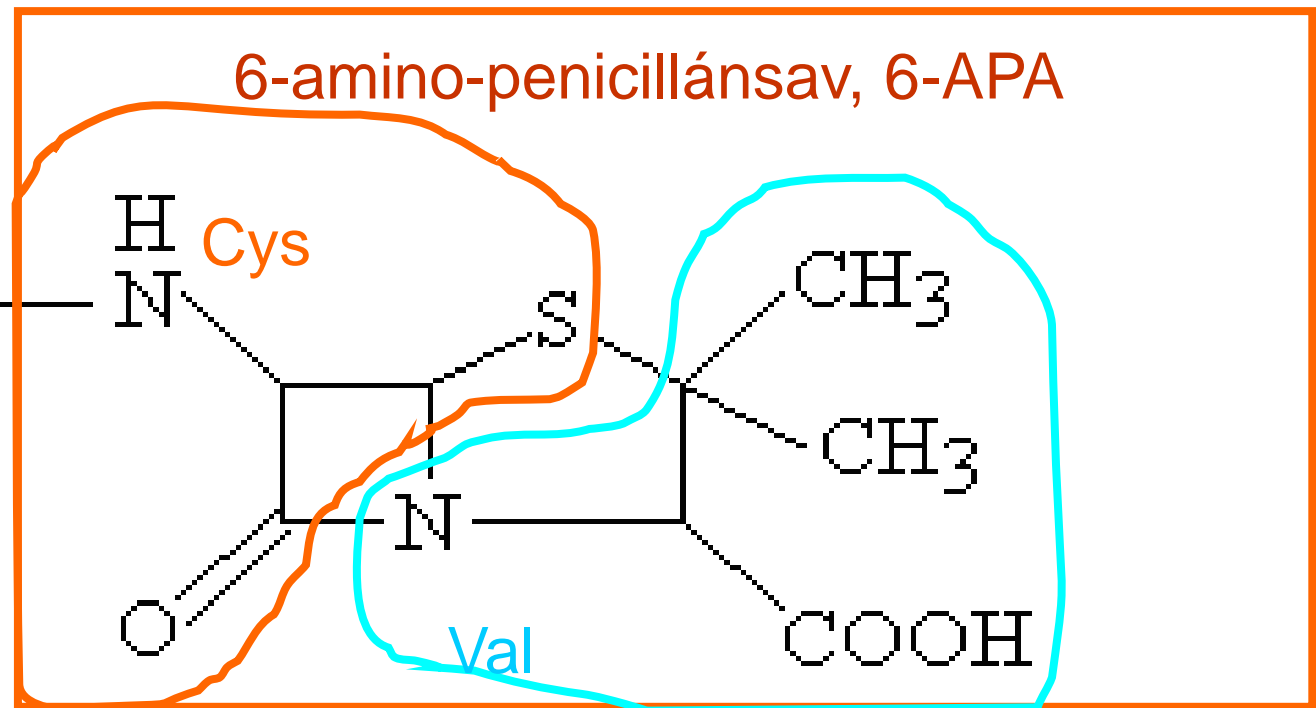
Az aminosavak egymással összekapcsolódva (*peptid kötés*) hozzák létre a fehérje láncokat.

Szerkezet: alapváz: 6-amino-penicillánsav

két aminosavból tevődik össze, cisztein + valin

R = bármilyen csoport.  
Ebben különböznek egymástól a penicillin molekulák.

Cys = cisztein  
Val = valin  
Ez 2 aminosav a 20 fehérjealkotó közül.



Megj.: a „gráf” csúcsai szén atomokat jelölnek. A szénen lehet hidrogén úgy, hogy a szén mindig 4 vegyértékű kell, hogy legyen. A hidrogéneket oda kell képzelni.

# A penicillin tulajdonságai

**BOMLÉKONY!** Savak, lúgok és enzimek hatására többféle re-akcióban is gyorsan bomlik – a gyomorsavtól is meg kell védeni.

Egyrészt az R oldallánc lecserélésével tudtak **savtűrő penicillint** létrehozni.

Másrészt bélben oldódó kapszulákba csomagolták, ami megvédi a gyomorsavtól.

Mennyiségét nem súlyra mérik, hanem az **antibiotikus hatását**:

1 biológiai egység: 50 ml-nyi standard összetételű tápoldatban éppen meggátolja egy adott *Staphylococcus aureus* törzs szaporodását.

1 IU (international unit) = 0,6 µg G-penicillin Na sónak felel meg.



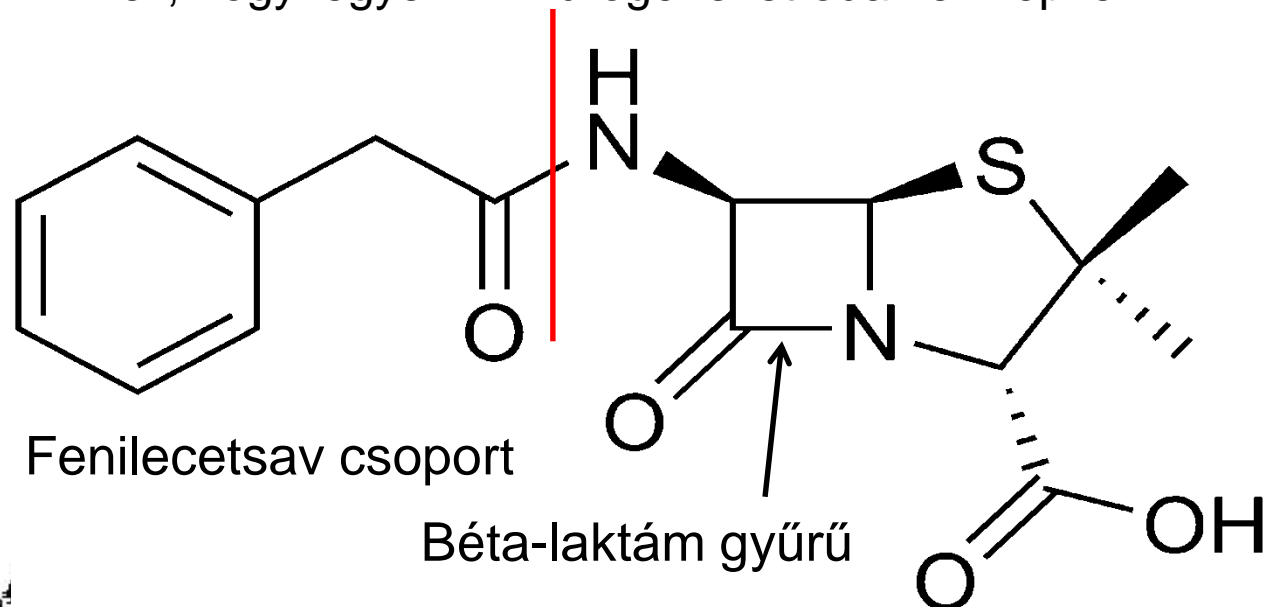
# G-penicillin/benzil-penicillin

Az R oldallánc eredetileg a fenil-ecetsav.

A G-penicillin a fermentált alapmolekula (ezt csinálja a penész), ebből gyártják a többit.

Savra érzékeny vegyület, a gyomorsav elbontja, ezért szájon át nem szedhető, csak injekcióban adták.

Megj.: a „gráf” csúcsai szén atomokat jelölnek. A szénen lehet hidrogén úgy, hogy a szén mindig 4 vegyértékű kell, hogy legyen. A hidrogéneket oda kell képzelni.

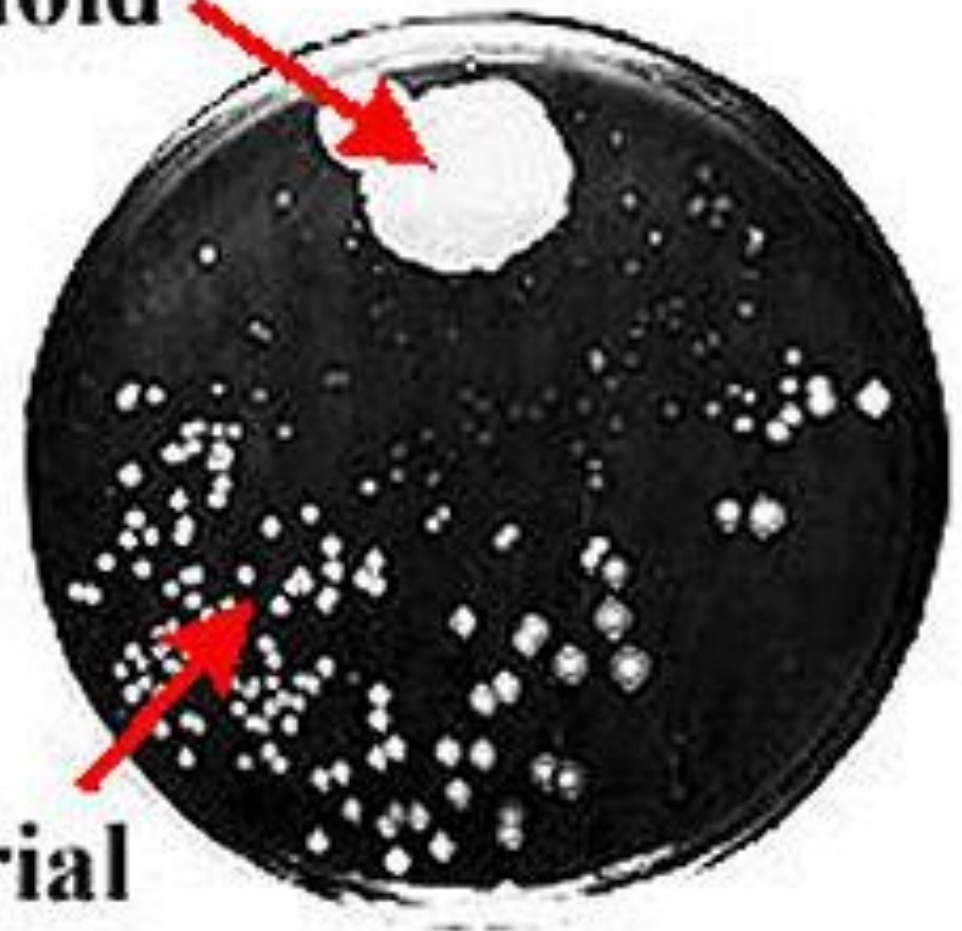


# *Fleming's original plate:*

A

1929 A. Fleming, k  
Izolálás, tisztítás, sze  
1940 hadianyaggá v  
1943 klinikai kipróbál  
*Penicillium chrysoge*  
1944 2,5 tonna  
szubmerz tenyészet,  
1946 32 tonna  
1952 Magyarországo  
1980 kb. 30.000 tonn  
2000 ~ 100.000 tonn

**mold**



**bacterial  
colonies**



BME

# A penicillin gyártás fejlesztése

**Fermentáció:** szerves (táp)anyagok enzimekkel vagy mikróbákkal történő átalakítása.

**Fermentációs** úton, mert a kémiai szintézis nem gazdaságos.

A technológia fejlesztése két fő irányban mehet:

Törzsmunka (biológia):

- törzsizolálás
- indukált mutáció
- szelekció
- törzsfenntartás

Technológia (mérnöki):

- Felületi/szubmerz
- Prekurzorok (4-8 x)
- Tápoldatoptimálás (cukorlimit, C/N, Fe ion)
- Levegőztetés, reaktor
- Szabályozások (pH, t)

*Ezek optimalizálási feladatok...*





# Törzsnemesítés

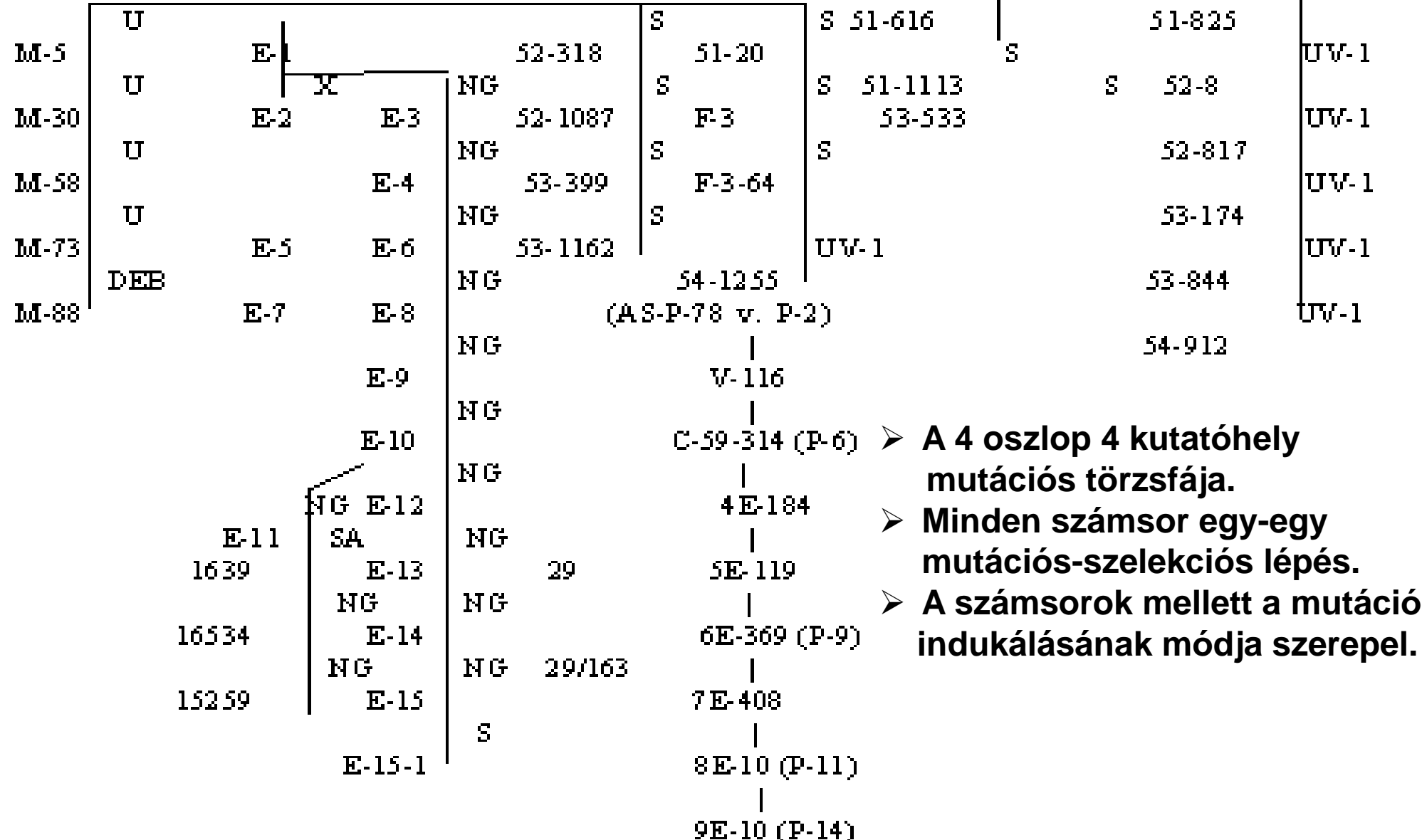
## Célok:

- hozamnövelés,
- fermentációs illetve feldolgozási kritériumok szerinti hatékonyság növelés
- az eredeti pigmenttermelés megszüntetése

## Eszközök:

- a célzott génmanipuláció igen bonyolult (sok gén vesz részt a folyamatban), a titernövekedés túlnyomó részét a régi (65 év – több ezer lépés) mutációs–szelekciós törzsjavítással érték el ( $\sim 2\text{-}3$  ppb  $\rightarrow \sim 50.000$  ppb).
- $1 \text{ ppb} = 1 \cdot 10^{-9}$ .





- A 4 oszlop 4 kutatóhely mutációs törzsfája.
- Minden számsor egy-egy mutációs-szelekciós lépés.
- A számsorok mellett a mutáció indukálásának módja szerepel.

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

Alkalmazott módszerek: S= szelekció,                      X= röntgenbesugárzás,                      UV= ultraibolya kezelés,  
 M= metil-bis(β-kloretil)amin,                      NG= nitrozo-guanidin,                      NM= nitrogénmustár

# A gyártás lépései:

- 1. Törzsfenntartás:** laboratóriumban, kis méretekben rendszeres átoltással és szelekcióval. Oka: a sikeres termelés után újra „friss” penész kultúrából kell kiindulni (amit még nem „sanyargattak meg”)
- 2. Inokulum lépcső(k):** a tenyésztés fokozatos méretnövelését jelenti.
- 3. Főfermentáció – két szakaszos –** lásd a következő diákat.
  - ”Fed batch” = rátáplálásos szakaszos, **glükóz limit**
  - Vágás: kb. 80.000 IU/ml ~ 5 % -os oldat
- 4. Feldolgozás, kulcslépése:**  
extrakció: vízzel nem elegyedő szerves oldószerrel kioldják a vizes fermentléből



# Fermentáció

Jellegzetes szekunder metabolit fermentáció, két szakasza van:

**Első szakasz** (kb. 40 h): a sejtek elszaporítása, jó tápanyagellátás intenzív levegőztetés, keverés, **elsődleges anyagcsere**.

*Itt még hagyjuk, hogy a penészek „jól érezzék magukat”.*

Tápanyagforrások az első szakaszban:

- szénforrások: néhány könnyen bontható cukor (glükóz, melasz), ami a szaporítás végére elfogy
- nitrogén: ebben a szakaszban még lehet  $\text{NH}_4$  sók formájában, de az a jó, ha a végére elfogy
- foszfor: foszfátként annyit kell bemérni a tápoldatba, hogy éppen elfogyjon a szaporodás végére (DNS szintézishez, energia tárolásához (ATP) használja fel a sejt).



# Fermentáció

**Második szakasz**, termelő fázis: 120-160 h, többszörös tápanyag limit, **kikényszerített másodlagos anyagcsere**.

*Érzékelje azt, hogy kevés a tápanyag...*

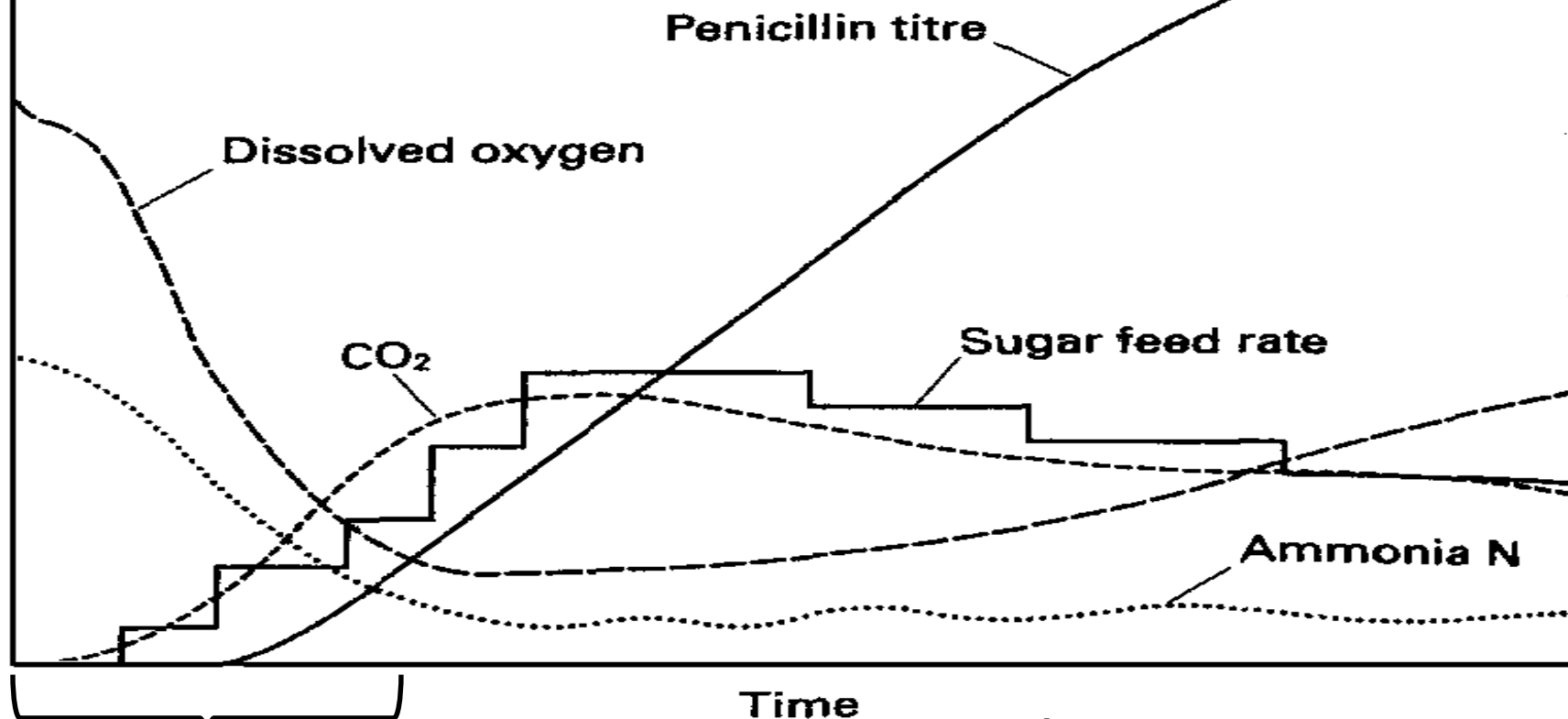
Tápanyagellátás a második szakaszban:

- szénforrás: limitáció (régen: nehezen bontható vegyületek: laktóz, keményítő, ma: glükóz adagolás apránként, az oldott oxigén szint alapján)
- nitrogén: szerves vegyületek, fehérje formájában: kukoricafehérje, szójadara, mogyoróliszt, esetleg kazein, halliszt → kis koncentráció, apránként adagolva
- foszfát: jelenlétében nem megy a másodlagos anyagcsere, ezért elfogyása után nem adagolnak többet
- penicillin prekursor (előanyag) : fenil-ecetsav, mérések alapján adagolják, koncentrációját a 2-4 g/l sávban tartják.



# A penicillin fermentáció lefutása

Folyamatosan mérnek bizonyos anyagcsere paramétereket. Innen látják, hol tart a fermentáció és hogy be kell-e avatkozniuk. 120-160 óra (5-7 nap).



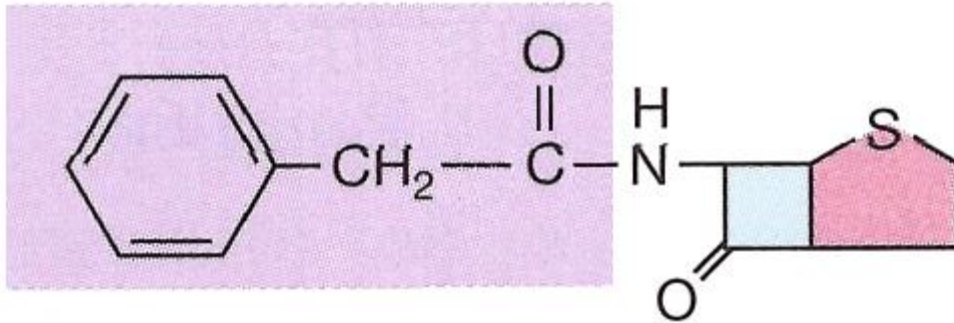
1. szakasz: sejtszaporodás. Nagy mennyiségű nitrogén és oxigén fogyasztás (aerob anyagcsere).

2. szakasz: penicillin termelés. Állandósítják a tápanyag és  $O_2$  hiányos állapotot.

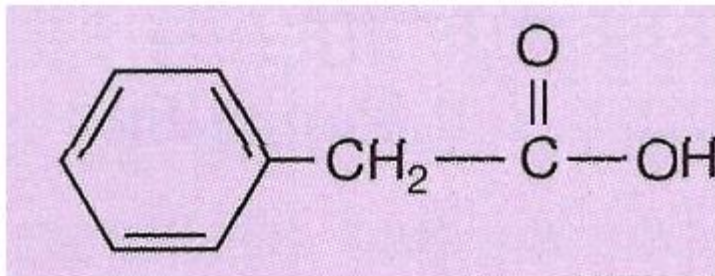
# Prekurzor

Olyan kémiai szintézissel előállított vegyület, amit „készen” adunk a mikroorganizmusnak, és az beépíti a termék molekulába. Így a tenyészetnek nem kell e molekularészt felépíteni – anyagot és energiát takarítunk meg a mikrobának.

**Optimális tartomány**a van: 2-4 g/l.



G penicillin



Fenil-ecetsav



# Félszintetikus penicillinek

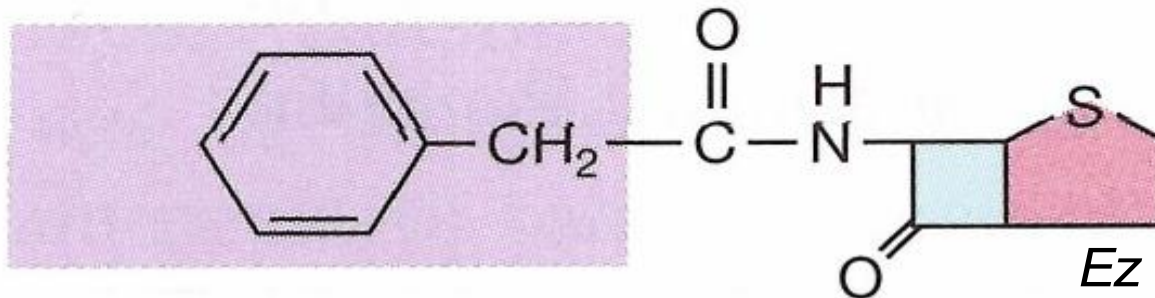
*Az alapmolekulát a mikroorganizmus állítja elő, de ehhez szintetikusan (szerves kémiai úton) olyan oldalláncot kapcsolnak, amelyre fermentációs úton nincs lehetőség.*

A fermentált alapvegyületek:

## Natural penicillins

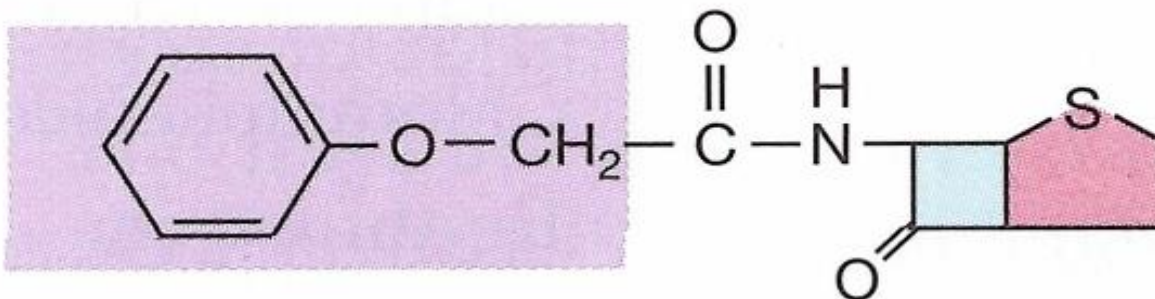
Fejlesztés hajtóereje pl.:

- Szűk hatás spektrum.
- Bomlékonyság.
- Allergén hatások.
- Rezisztencia kialakulása.



Penicillin G  
(Gram-positive cocci)

*Ez csak a Gram-pozitív kokkuszokra hatékony és savra is érzékeny.*

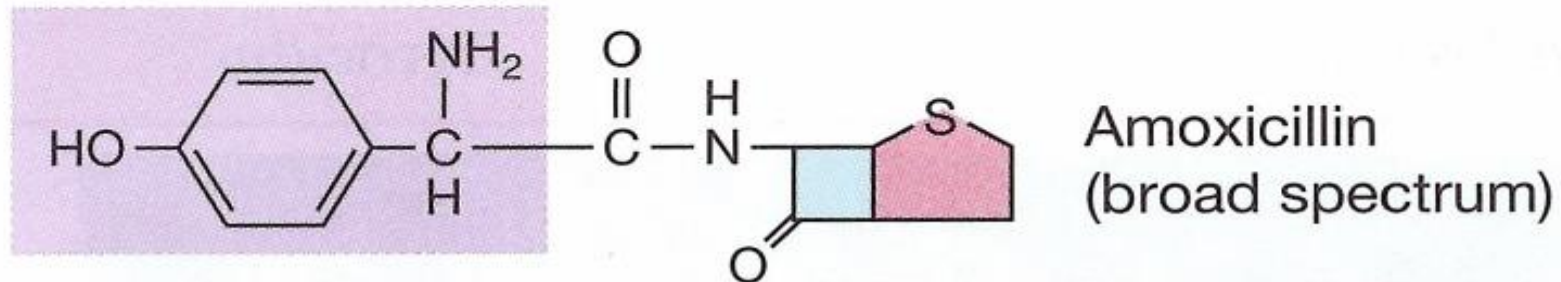
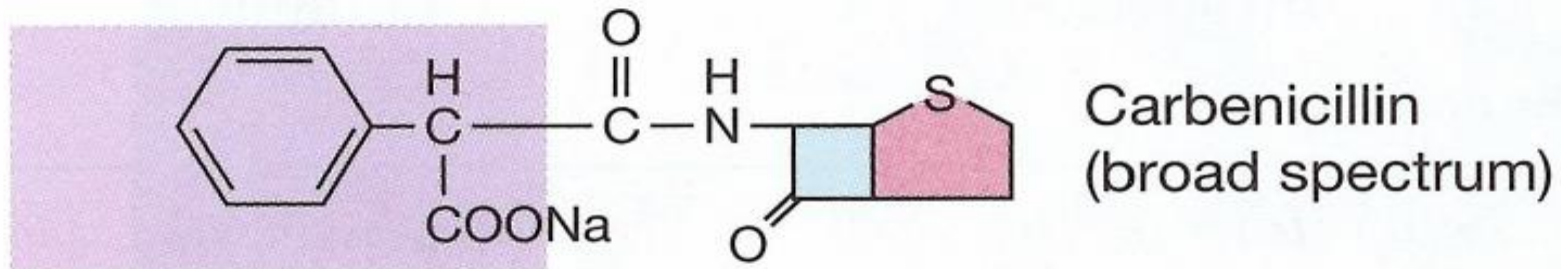
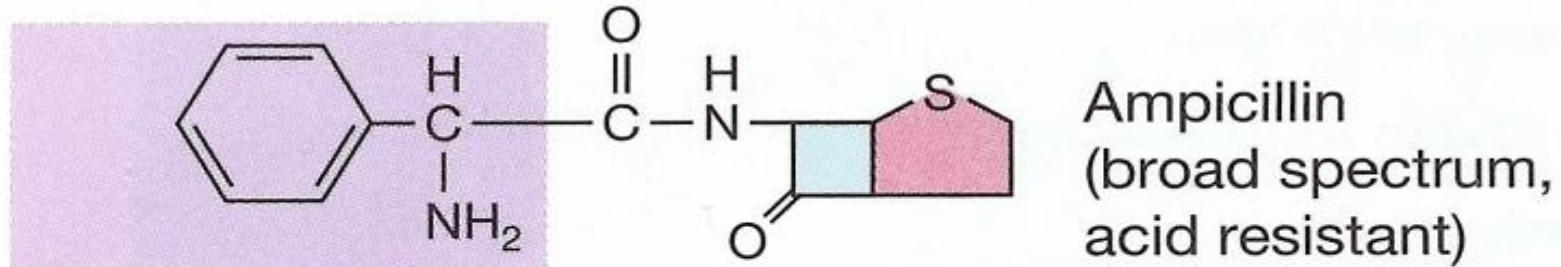


Penicillin V  
(acid resistant)



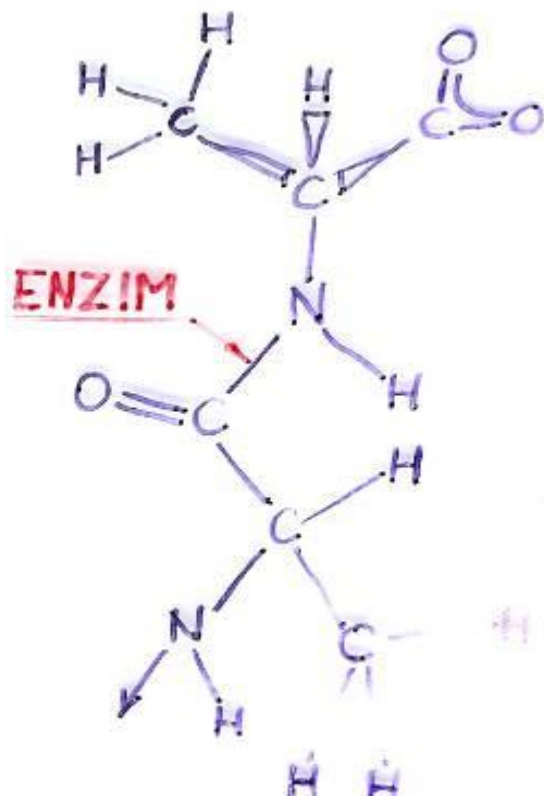


# Félszintetikus penicillinek

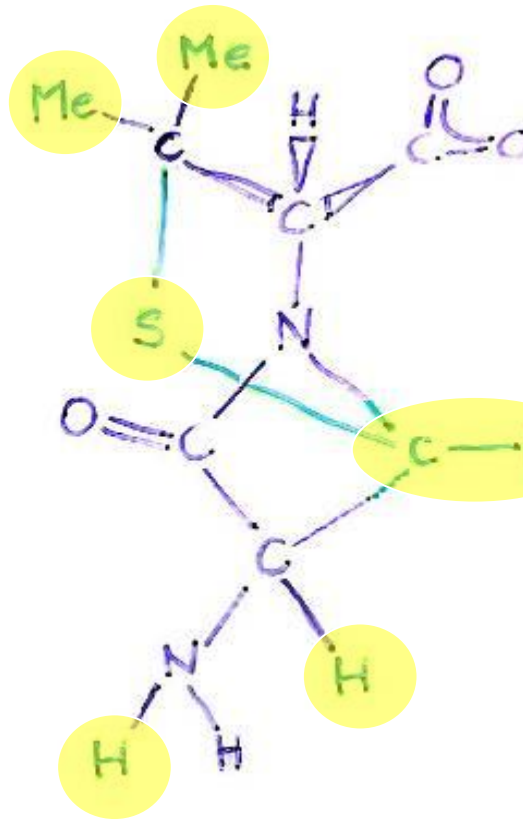


# A penicillin hatásmechanizmusa: szerkezetanalógián alapul

D-Ala-D-Ala



penicillin



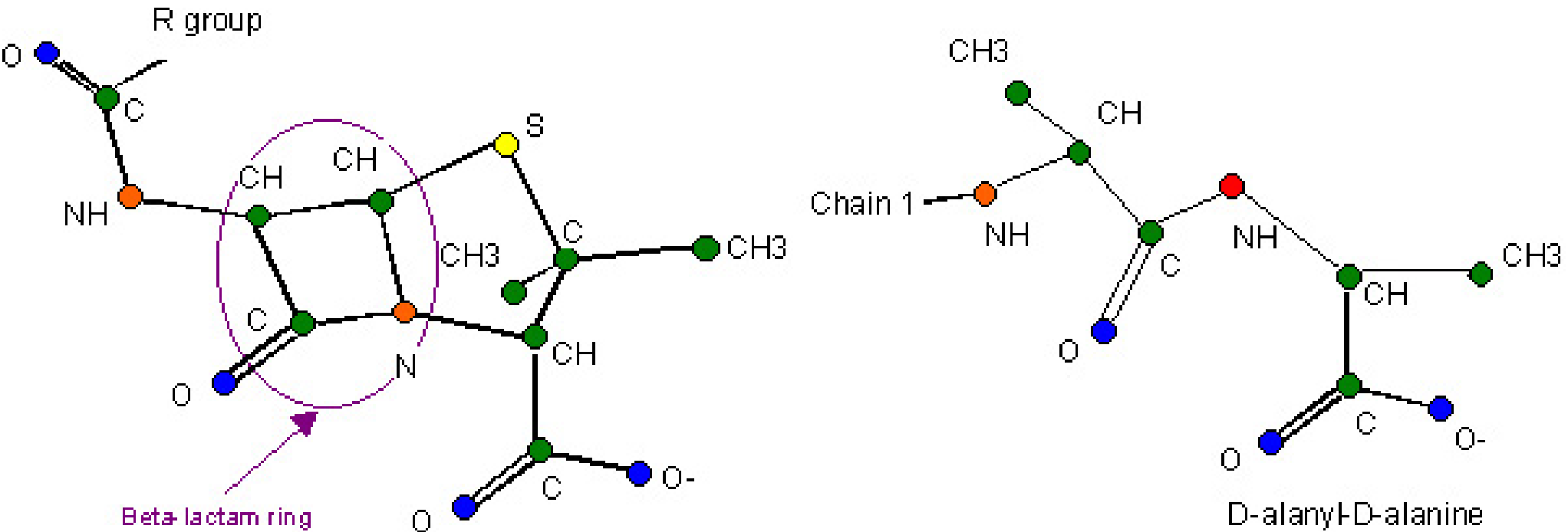
Irreverzibilisen kapcsolódik egy sejtfallépítő enzim kötőhelyéhez

→ a sejtfallépítés leáll

→ a sejt nem tud nőni, osztódni, elpusztul



# A penicillin hatásmechanizmusa: szerkezet-analógián alapul



## Penicillin

The four member beta lactam ring is attached to a five member ring. The R group will determine the spectrum of activity. The structure of D-alanyl-D-alanine is given for comparison.

A baktérium sejtfalának szintézisét (előállítását) végző enzimnek egy D-alanil-D-alanin peptidlánc véget kellene a sejtfal térhálósításához megkötni (jobbra): ha ehelyett egy penicillin molekulát köt meg (balra), akkor nem tudja elereszteni többé, és ezzel az enzim molekula használhatatlanná válik.

# A szekunder metabolit gyártás összefoglalása

## Törzsfejlesztés:

a célzott génmanipuláció túl bonyolult, mert a bioszintézis nagyon sok lépésből áll, és sokféle szabályozás érvényesül.

A klasszikus mutációs – szelekciós módszert ismételve évtizedeken keresztül. Lassan eléri a határait.

## Technológia:

Kétszakaszos fermentáció, előbb sejtszaporítás, azután termék-képzés

## Piaci helyzet:

a szabadalmak lejártak, generikus készítmények, éles versenyhelyzet, nyomott árak. A gyógyszerkönyvek szigorú előírásai miatt a kínaiak még nem tudnak előretörni, de az indiaiak igen (outsourcing).

