

# FEHÉRJÉK ELŐÁLLÍTÁSA GÉNMANIPULÁLT MIKROORGANIZMUSOKKAL

2020. április 6.

A biotechnológiai ipar termékei:

- 4.1. Elsődleges anyagcseretermékek
- 4.2. Másodlagos anyagcseretermékek
- 4.3. FEHÉRJÉK, amelyeket a sejt eredeti genomja nem tartalmaz, máshonnan bevitt gén terméke.



# 1. Inzulin

Az inzulin emlőshormon; ez volt első rekombináns módszerrel előállított fehérje. A gyógyászati célra történő humán inzulin éves termelése eléri a 2 tonnát. Az inzulint a hasnyálmirigy (pancreas) Langerhans-szigetei termelik. Antagonista párja a glükagon, a két hormon együtt biztosítja a vércukorszint megfelelő szabályozását. Az inzulint először 1922-ben izolálták kutya pancreasból. Az aminosavszekvencia meghatározását 1955-ben Sanger végezte el.

Nélkülözhetetlen a cukorbetegek számára.

Diabetes: cukor anyagcsere zavar, megemelkedik a vércukorszint.

Inzulin: kettős peptidlánc, per os (szájon át) nem adható, mert lebomlana. Ezért injekció formájában adják, de inhalálással beadható inzulin előállítására is történtek kísérletek.



# Hormonok

- Kémiai úton történő jelátvitelt végző molekulák.
- (Az idegrendszeren keresztül történő jel továbbítás elektromos impulzusokkal történik.)
- Szabályozó szerepük van a szervezetben.
- Belső elválasztású mirigyek termelik őket.
- Nagyon kis mennyiségben is hatékonyak.
- A sejtek felületén megtalálható **receptor**okhoz kötnek.
- A **receptor**hoz való kötődés anyagcsere változást eredményez.

*Receptor: a sejten kívülről érkező kémiai jeleket fogadó fehérje molekula. A kémiai jelek egy másik molekula formájában érkeznek, ami a receptorhoz kapcsolódva megváltoztatja annak térbeli szerkezetét. A szerkezeti változás a sejten kívülről érkező jel továbbításához vezet.*



# Az inzulin szerepe a szervezetben

***Tápanyagot (glükózt) tesz a vérből hozzáférhetővé a sejtek számára.***

- Az inzulin egy kémiai jelátvitelt végző molekula = egy hormon.
- Hormon többféle szerkezetű molekula is lehet. Az inzulin egy fehérje.
- A sejtek szőlőcukor (glükóz) felvételét segíti elő a vérből.  
(Maguktól erre csak az agy sejtjei képesek.)
- Ezáltal a vércukor szint állandó értéken tartásában játszik szerepet.
- Ha az inzulin a vérbe kerül, a sejtek fel tudják venni a vérből a glükózt.
- Ezáltal a sejtek tápanyaghoz jutnak, a vércukor szint pedig lecsökken.
  
- Az inzulint a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjei termelik.
  
- A glukagon nevű hormon az inzulinnal ellentétes hatású, a máj glikogén (glükóz polimer) raktáraiból képes glükózt juttatni a vérbe.



# A cukorbetegség (*Diabetes mellitus*)

*A vércukor szint szabályozásának zavara.*

- A sejtek a vérből nem tudják a glükózt felvenni. → Éheznek.
- Emiatt a vércukor = glükóz szint a vérben folyamatosan emelkedett.
- A cukor a vizelettel nagy mértékben ürül és vizet szív magával (ozmózis).
- Életveszélyes állapot léphet fel a túl alacsony és a túl magas vércukor szint következtében.
- Komoly szövődmények többek között az erek falának károsodása miatt.



# A cukorbetegség (*Diabetes mellitus*) típusai

*A vércukor szint szabályozásának zavara.*

- **Fiatalkori** (I-es típusú) cukorbetegség: **az inzulin hiányán alapszik**. Oka: elpusztulnak a hasnyálmirigy inzulint termelő sejtjei ( $\beta$ -sejtek). Autoimmun betegség, de ezt gyerekkori vírusfertőzés is előidézheti.
- **Időskori** (II-es típusú) cukorbetegség: **elsődlegesen a sejtek felületén található inzulin receptorok károsodnak**. Civilizációs ártalom.

**Inzulin hullám** magas **glikémiás indexű** ételek fogyasztásakor →

A sejtek védekezni kezdenek a túl nagy cukor koncentráció ellen →

A receptorok érzéketlenné válnak az inzulinra → a vércukor szint tartósan

magas → az agy fokozott inzulin termelésre készíti a hasnyálmirigyet →

végül kimerül a hasnyálmirigy → és beáll az inzulin hiányos állapot.

***GI = (tápanyag vércukorszint emelő képessége / szőlőcukor v. e. k.)\*100***



# A cukorbetegség (*Diabetes mellitus*) kezelése

- Az inzulin kívülről történő pótlásával történik.
- GOND: az inzulin egy fehérje → lebomlik a tápcsatornában →
- nem lehet szájon át adni.
- Injekció a régóta bevált módszer,
- de vannak kísérletek pl. nyálkahártyán keresztül történő adagolásra.

*Hogyan tudunk gyógyászati felhasználásra inzulint előállítani?*

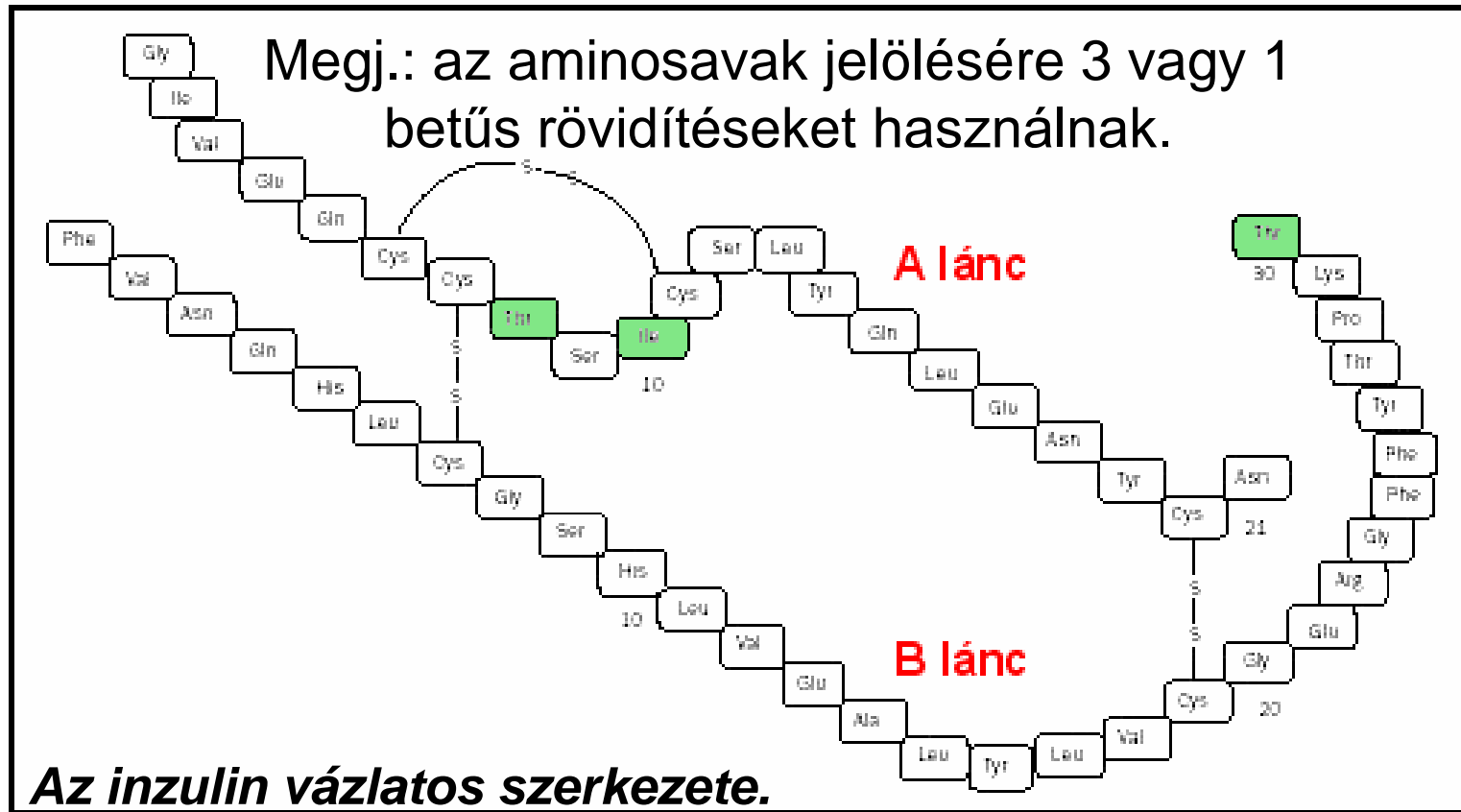
*A kérdés megválaszolásához ismerjük meg a szerkezetét és bioszintézisének (élő szervezetben történő előállításának) folyamatát!*



**Az inzulin vázlatos szerkezete.**

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

# Az inzulin szerkezete



- 2 aminosav (peptid) láncból épül fel.
- „A” lánc: 21 aminosav. „B” lánc: 30 aminosav.
- A 2 láncot 2 **diszulfid híd** tartja össze.
- Egy 3. diszulfid híd az „A” láncon belül jön létre (térszerkezeti stabilizálás).

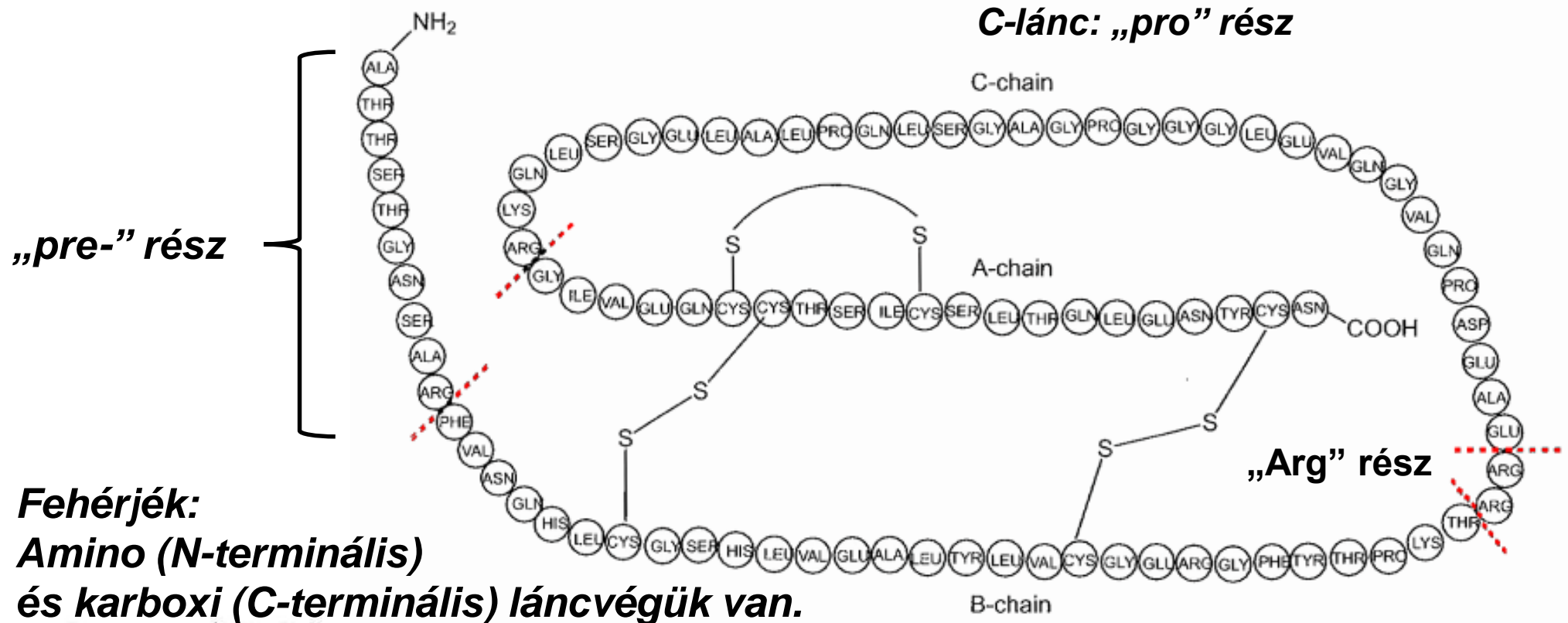
oxidáció

**Diszulfid híd: 2 db cisztein-SH → 1 db cisztein-S-S-cisztein**



# Az inzulin előállítása a szervezetben (bioszintézis)

- Az inzulin génje tartalmaz intronokat! (De az inzulin **nincs glikozilálva.**)
- 2 peptid lánc, de csak egy inzulint kódoló gén van. Hogy lehet ez?
- Az inzulin egyetlen fehérjeláncként keletkezik (pre-pro-Arg inzulin).
- Ebből három hasítással és két Arg eltávolításával alakul ki a szerkezete.

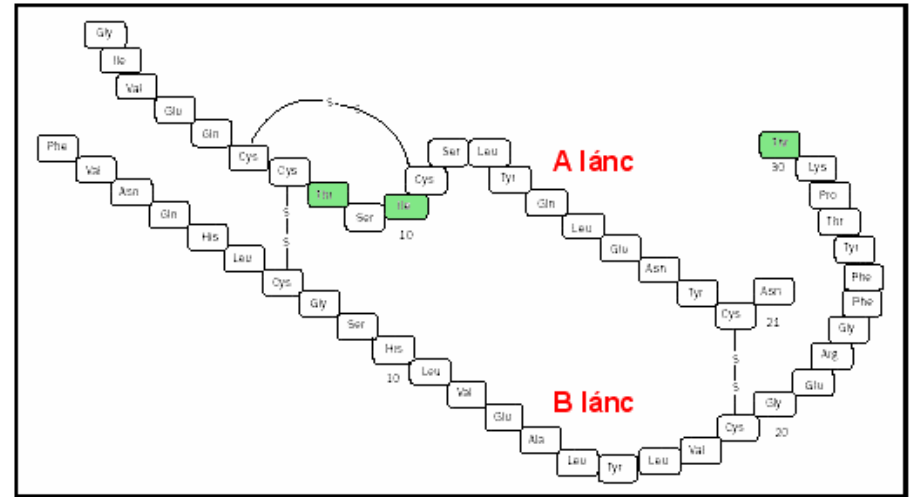


# Az inzulin szerkezete

*Van lehetőségünk embereket állati eredetű inzulinnal kezelni.*

A humán, marha és sertés inzulin között csak néhány aminosav a különbség:

A sertés jobb választás, mint a marha, mert csak 1 aminosav az eltérés.



|        | Aminosav |      |        |
|--------|----------|------|--------|
|        | S.       | 10.  | 30.    |
| Marha  | Ala      | Val  | Ala    |
| Sertés | Thr      | ILeu | Ala    |
| Ember  | Thr      | ILeu | Thr    |
|        | A lánc   |      | B lánc |

GOND: még ez az 1 aminosavas eltérés is okozhat allergiás reakciót, ami az inzulin adagolás ismétlésével fokozódik.



# AZ INZULIN ELŐÁLLÍTÁSA

1. Kémiai szintézis aminosavakból – nem gazdaságos
2. Kivonás sertés hasnyálmirigyből és átalakítás humán inzulinná
3. Fermentáció génmanipulált mikroorganizmusokkal
  - Az A és B lánc termelése külön-külön *E. coli* baktérium törzzsel, majd összekapcsolás
  - pro-inzulin fermentációja *E. coli*-val, majd átalakítása
  - Pre-pro-inzulin fermentációja *E. coli*-val, hasítások
  - Pro-inzulin fermentáció *S. cerevisiae*-vel, átalakítás

*Vegyük sorra őket!*



# Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

A klasszikus eljárás. Vágóhidakon összegyűjtött hasnyálmirigyből extrahálják a sertés inzulint.

- nincs elég belőle
- az egy aminosav különbség hosszú távon allergiát okozhat

Ezért inkább **átalakítják, lecserélik a láncvégi alanint**. Egy enzimmel 😊.

A **tripszin** szintén a hasnyálmirigyből nyerhető **peptidáz**, ami a bázikus aminosavak (Arg, Lys) melletti peptidkötést bontja → lecsípi a láncvégi alanint. **Egyensúlyi folyamat**, visszafelé is megy, a láncvégi lizin vagy arginine aminosavra ráköthet még egy aminosavat.

Ha nagy fölöslegben treonint adunk a rendszerbe, akkor az alanin fokozatosan lecserélődik treoninra.

A mellékreakciók visszaszorítása érdekében Thr-észtert adnak, hogy ha az enzim “felkapcsolta” már a treonint, ne tudjon mellé még egyet “felkapcsolni”.

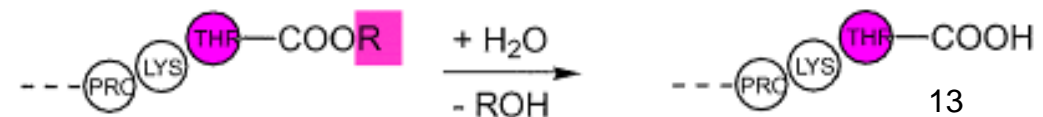
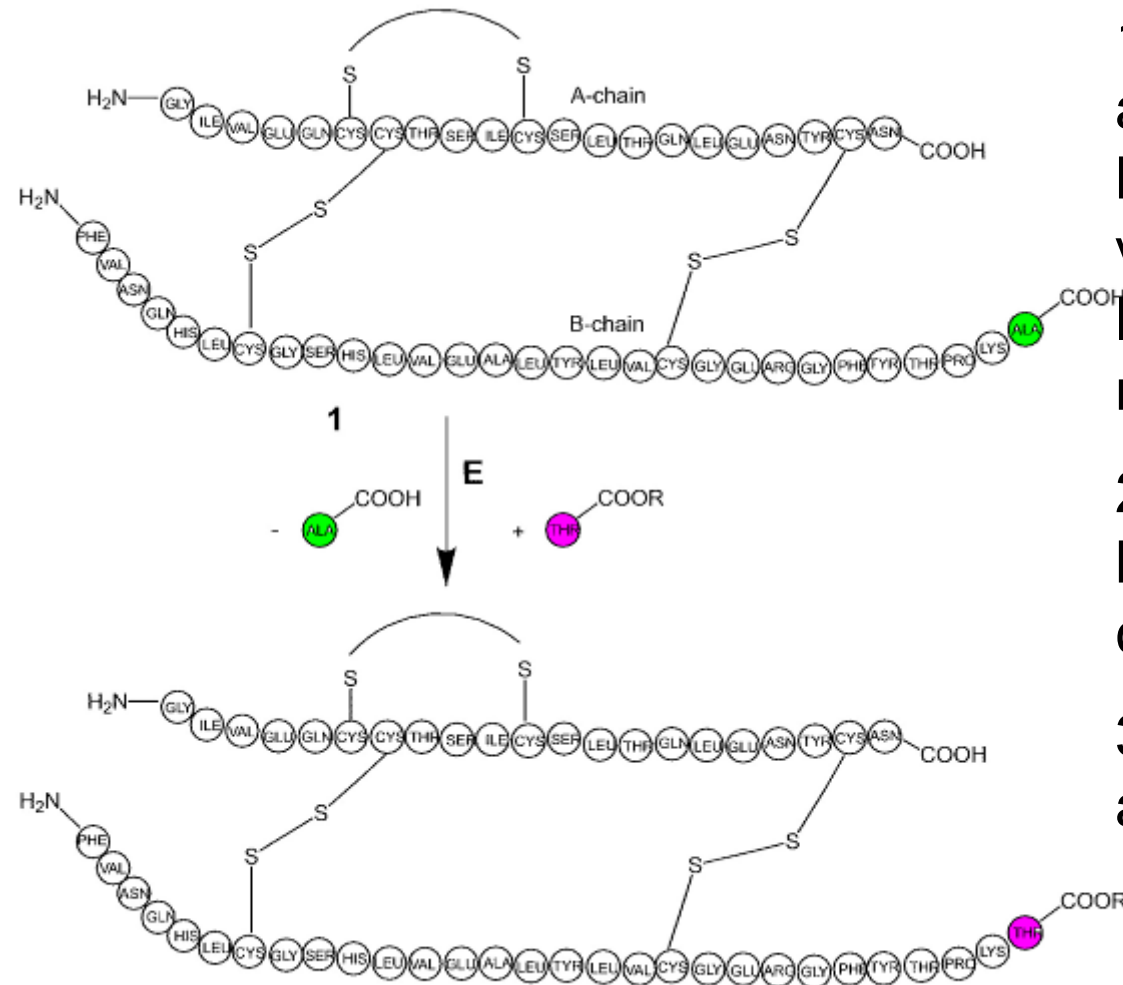
*Peptidázok vagy proteázok: fehérjéket meghatározott aminosav oldalláncok után hasító enzimek, vö. restriktív endonukleázok (DNS hasító enzimek).*

# Kivonás hasnyálmirigyből - átalakítás

1. Tripszinnel lehasítják a láncvégi alanint. Spec. körülmények kellenek (+6 fok, szerves oldószer-víz elegy), hogy a tripszin a láncközi arginint ne ismerje fel, mint hasító helyet.

2. Nagy treonin-észter felesleg hozzáadásával az alanint treoninra cserélik. (Az észter **védő csoport.**)

3. A treonin észter hidrolízisével alakul ki a humán inzulin:



# Inzulin fermentációs előállítása

Prokariótákkal is megoldható, mert:

Viszonylag rövid láncok, **nincs glikozilezés, metilezés**, de: két lánc, három diszulfid híd – nehéz jól összepárosítani. Az intron kivágást a prokarióták nem tudják megcsinálni, ezt ki kell küszöbölni.

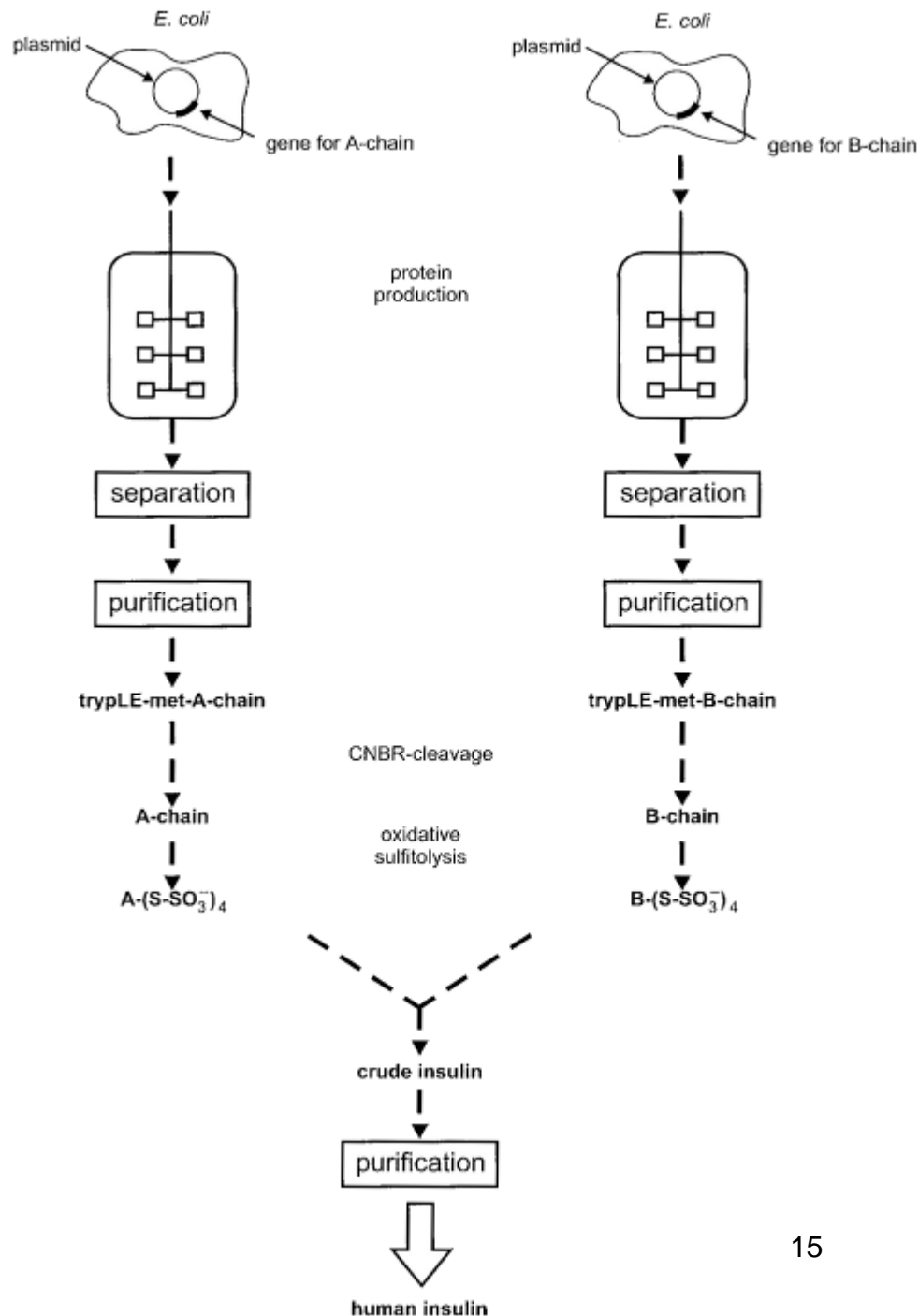
- megoldották a két lánc külön-külön bevitelét és fermentációját, majd összekapcsolását is
- és az egészet egyben is.



# Kettős fermentáció

- A két láncot két külön plazmidba vitték be.
- Két *E. coli* törzs, két külön fermentáció.
- A két aminosav láncot a bacikból külön-külön kinyerik és tisztítják.
- Végül összekapcsolás.

Ez a diszulfid hidak létrehozását jelenti és már kémiai módszerrel, a baktériumokon kívül történik.





# Inzulin fermentációs előállítása

Az egész lánc előállítása génmanipuláció szempontjából nem nehezebb, mert a teljes inzulin gén (pre-pro-inzulin) befér egy *E. coli* plazmidba, de a utána a lánc hasítása bonyolultabb (két enzimes lépés):

1. Hasítás három helyen Arg mellett (tripszin, sertés pancreasból)
2. A B és C lánc közötti két Arg lecsípése (karboxipeptidáz B, exopeptidáz, szintén sertés pancreasból)

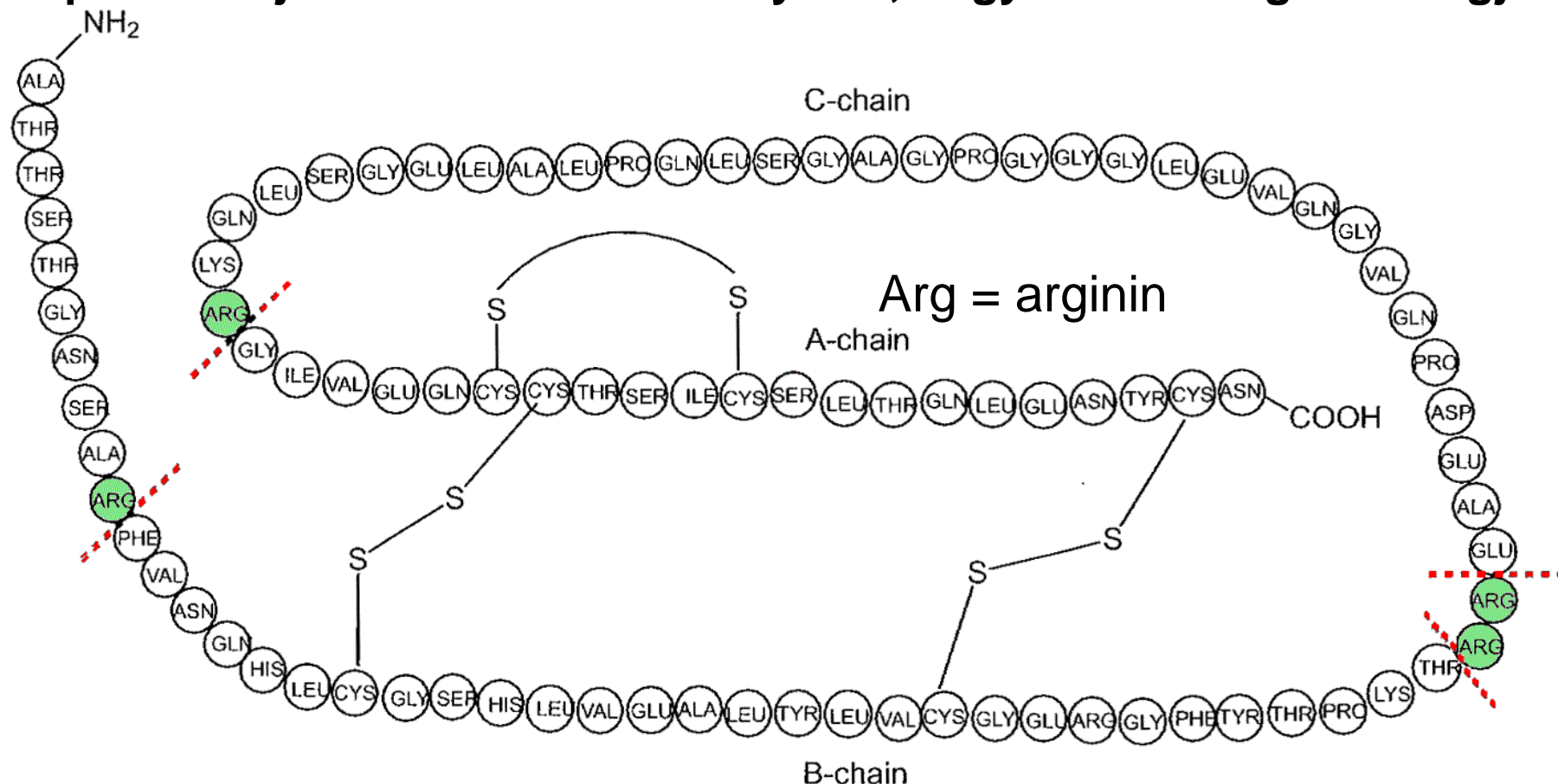




# A pre-pro-inzulin enzimes hasításai

Tripszinnel: ez a Lys és Arg oldalláncok után hasít.

Optimalizálják a reakció körülményeket, hogy csak az Arg után vágjon.



Le tudja vágni a „pre” részt és ki tudja hasítani a C-láncot, de a B-lánc végén otthagya 2 Arg-t. → exopeptidáz enzimmel hasítják le őket.

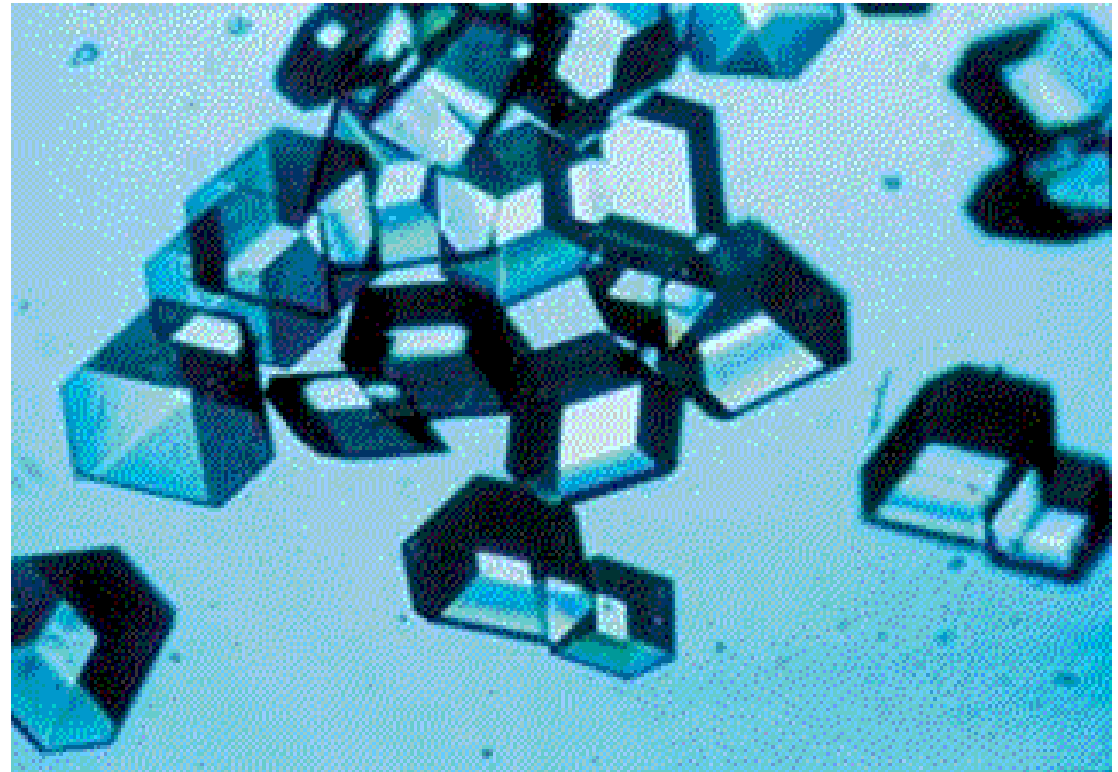
Vö.: Kisgömböc a mesében...



# Az inzulin tisztítása és feldolgozása

1. Méretkizárásos (kis molekulák elválasztása).
2. Ioncsere kromatográfia.
3. Kristályosítás: Zn ionnal. Így stabil, tárolható.

Mivel injekcióval juttatják a vérkeringésbe, sterilnek, jól oldhatónak, stabilnak kell lennie...



# VAKCINAGYÁRTÁS (Edward Jenner, vacca = tehén latinul)

A **védőoltás** (vakcina) gyengített vagy elölt kórokozókat, azok részeit vagy kész ellenanyagot (immunfehérjét = antitestet) tartalmazó készítmény.

A védőoltások célja a szervezet fertőző betegségek elleni védekezését elősegíteni. Ez történhet aktív vagy passzív immunizálással. Az aktív immunizálás az immunrendszer “ösztönzése” egy adott kórokozóra specifikus immunsejtek és immunfehérjék termelésére. A passzív immunizálás során közvetlenül az adott kórokozóra specifikus immunfehérjéket juttatják be a szervezetbe.

Immunrendszer: sejtes és “oldékony” (humorális, molekuláris) immunválasz.

**Antigén: „idegen anyag”**. Bármilyen, amit az immunrendszer idegen anyagként ismer fel.

**Antitest (immunfehérje, immunoglobulin):** olyan fehérje molekula, amit az immunrendszer termel egy adott antigén = idegen anyag felismerésére.

| <b>Passzív immunizálás</b>                      | <b>Aktív immunizálás</b>                       |
|---|--|
| antitest (antitoxin) bevitele                   | antigén bevitele                               |
| más sejtek termelik az antitesteket             | a szervezet maga termeli az antitesteket       |
| terápia/gyógykezelés – fennálló betegség esetén | profilaxis/megelőzés – jövőbeli betegség ellen |

# VAKCINAGYÁRTÁS

Az immunválaszt kiváltó anyag jellege szerint a vakcina lehet:

1. Élő, attenuált (legyengített, már nem virulens) kórokozó baktérium:  
pl. BCG = Bacille Calmette Guérin, a *Mycobacterium tuberculosis* avirulens, immunogén törzse.
2. Elölt, inaktivált kórokozó. Nem szaporodó, nem fertőzőképes, de fehérjei **immunogén**ek maradtak.
3. Alegység- (subunit) vakcina: az egész kórokozó helyett csak egy-két jellegzetes immunogén fehérjét viszünk be. Biztonságosabb, mert nincs benne baktérium / vírus DNS vagy vírus RNS.



# VAKCINAGYÁRTÁS

Technológiai szempontból több eltérő gyártási mód létezik:

1. Emlős állatokban (nyulak, kutyák, disznók, lovak) – passzív immunizálásra jellemző
2. Csirkeembrióban (tojásban) – pl. influenza elleni vakcina
3. Attenuált baktérium fermentációval (szubmerz, aerob tenyésztés) – pl. BCG vakcina
4. Rekombináns fehérjék előállítása baktérium fermentációval
5. Vírus szaporítás állati sejtek tenyésztésével
6. Rekombináns fehérjék előállítása állati sejtek tenyésztésével



# REKOMBINÁNS FEHÉRJE VAKCINÁK

1. Izolálni, esetleg szintetizálni az antigén fehérjét kódoló gént.
2. Génmanipulációval bevinni egy jól kezelhető gazdaszervezetbe, expresszálni.
3. Fermentációval előállítani a fehérjét.
4. Feldolgozás: extracelluláris ↔ intracelluláris esetben
  - kíméletes sejtelválasztás
  - tisztítási lépések



A Hepatitis-B és a száj- és körömfájás vakcina előállításáról nem beszéltem az órán, ezeket nem kell a ZH-ra tudni.



# HEPATITIS B VAKCINA

HBV – hepatitis B vírus – hatására a májsejtek pusztulnak, májgyulladás, elégtelenség, sárgaság, akut vagy krónikus májzsugor, esetleg carcinoma (daganat) alakulhat ki.

Világszinten a lakosság 5%-a fertőzött ~350 millió ember

Fertőzés átvitele: vérrel, tűvel, szexuális úton

Lappangási idő: 1,5 – 3 hónap, az illető ezalatt is vírusgazda

A vírus egységek a májsejtekben szintetizálódnak, a májsejtek szétesésével a vérbe kerülnek. A vírus fehérjék a betegek véreből kimutathatók, sőt izolálhatók – ez volt az első vakcina. → korlátozott mennyiség és veszélyes (vírusátvitel: HBV, HIV is!)





# HEPATITIS B VAKCINA

HBV – hepatitis B vírus – 42 nm-es, háromféle antigénje van:

s – surface (felületi),

e – endo (belső),

c – core („mag”)

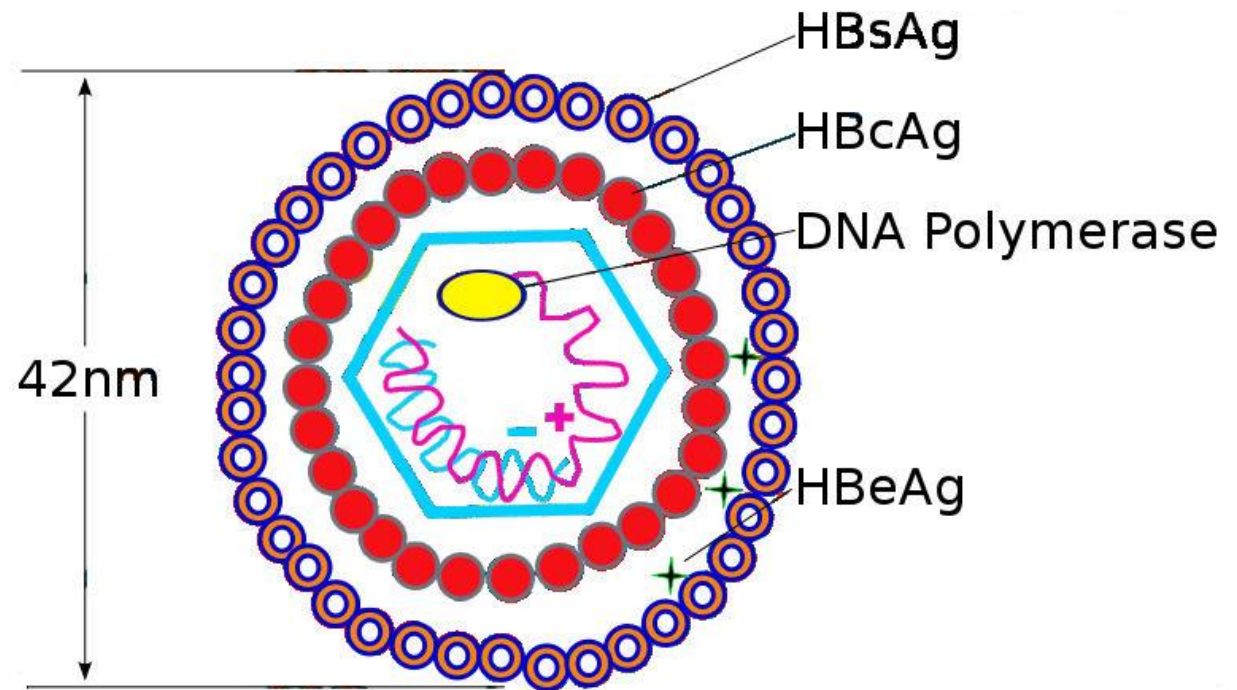
Az immunrendszer

Mindhárom antigént

Képes felismerni.

+ a DNS és a

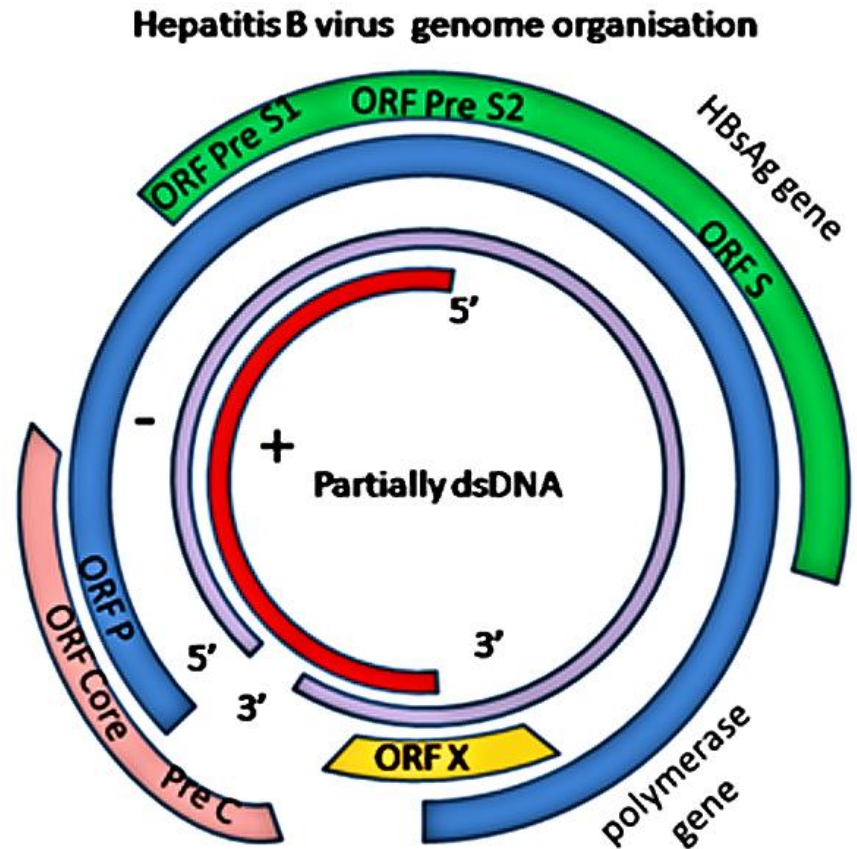
DNS-polimeráz



# HEPATITIS B VAKCINA

A HBV DNS két szála nem egyforma hosszú: a - szál (kodogén) ~3200 nukleotid, a + szál ennek csak 55-75%-a.

A HBsAg fehérje 226 aminosav, **lipoprotein és glikozilált is**, ezt klónozták.



# HEPATITIS B VAKCINA

A felületi antigén génjét először *E. coli* plazmidba klónozták, termelte is, de:

- nem glikozilált forma
- nem alakult ki az aktív folding

## Bevitték

- élesztőbe (intracelluláris, glikozilált)
- emlős sejtbe (extracelluláris, glikozilált)

Mindkettő aktív vakcina, az élesztős technológia olcsóbb és biztonságosabb (nincsenek onkogének, vírusok)



# HEPATITIS B VAKCINA

Az élesztőbe bevitt ingázó vektor (kettős plazmid) szerkezete:

Kétféle marker gén:

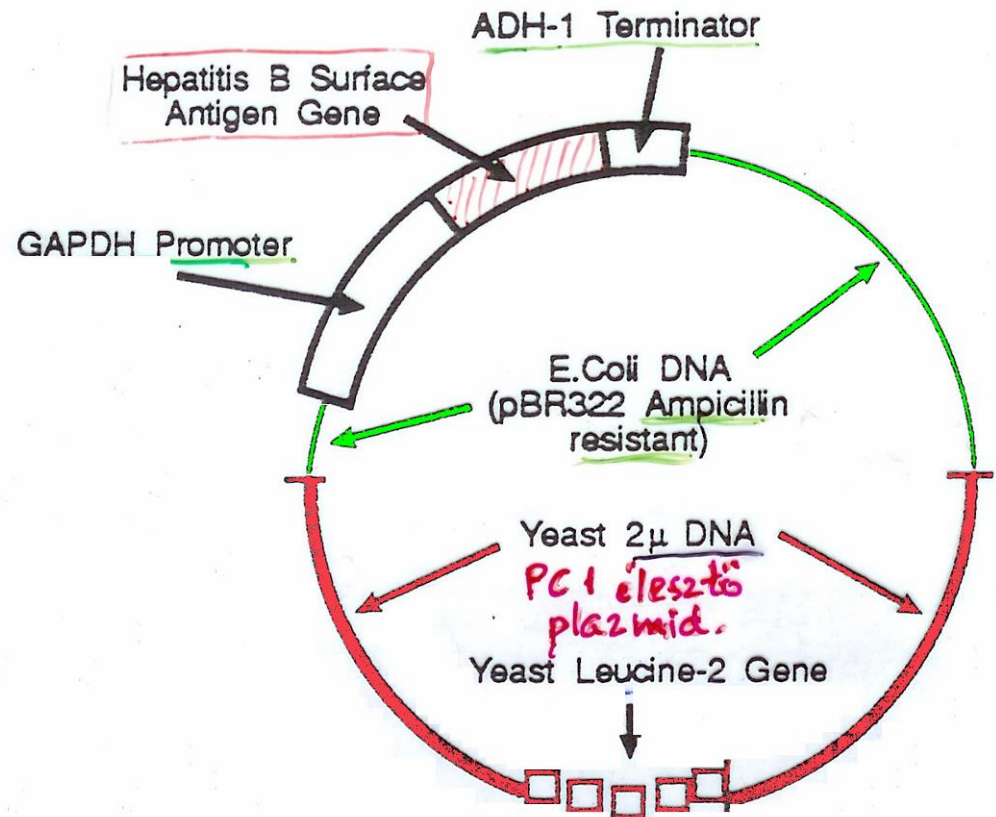
- ampicillin rezisztencia
- leucin-2 gén (az élesztő Leu<sup>-</sup> mutáns)

Expressziós kazetta:

- konstitutív promóter
- az S fehérje génje
- terminátor

Két replikációs origó:

- egyik a coliban, a másik az élesztőben működik



# HEPATITIS B VAKCINA

Technológia: szakaszos fermentáció

Plazmidtartalom növelése Leu-mentes tápoldattal

Azután termeltetés komplex tápoldaton

Feldolgozás:

Sejtek lecentrifugálása

Sejtfeltárás

...

Tisztítási lépések

...

Diszulfid hidak kialakítása kémiai reakcióval

...

Kiszerezési lépések



# HEPATITIS B VAKCINA

A termék vizsgálata:

- Azonosítás: immunanalitika
- DNS tartalom: max 10 pikogram/l !!!
- Hatékonyság: állatokban
- Pirogének: nyúlfül (max. 0,5 fok 4 óra múlva, LAL teszt)
- Mikrobiális tisztaság
- Stabilitás: 2-3 év +4 fokon





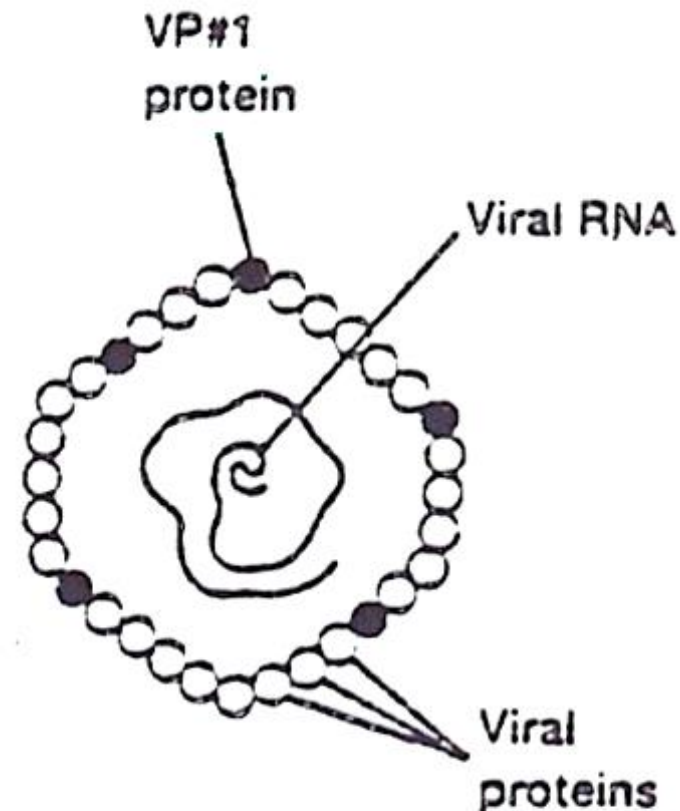
# SZKF VAKCINA

SZKF = száj- és körömfájás vírus,  
kérődzőkre patogén

**RNS** vírus (reverz transzkriptáz)

Alegység (subunit) vakcina

Az első rec vakcina az állategész-  
ségügyben.

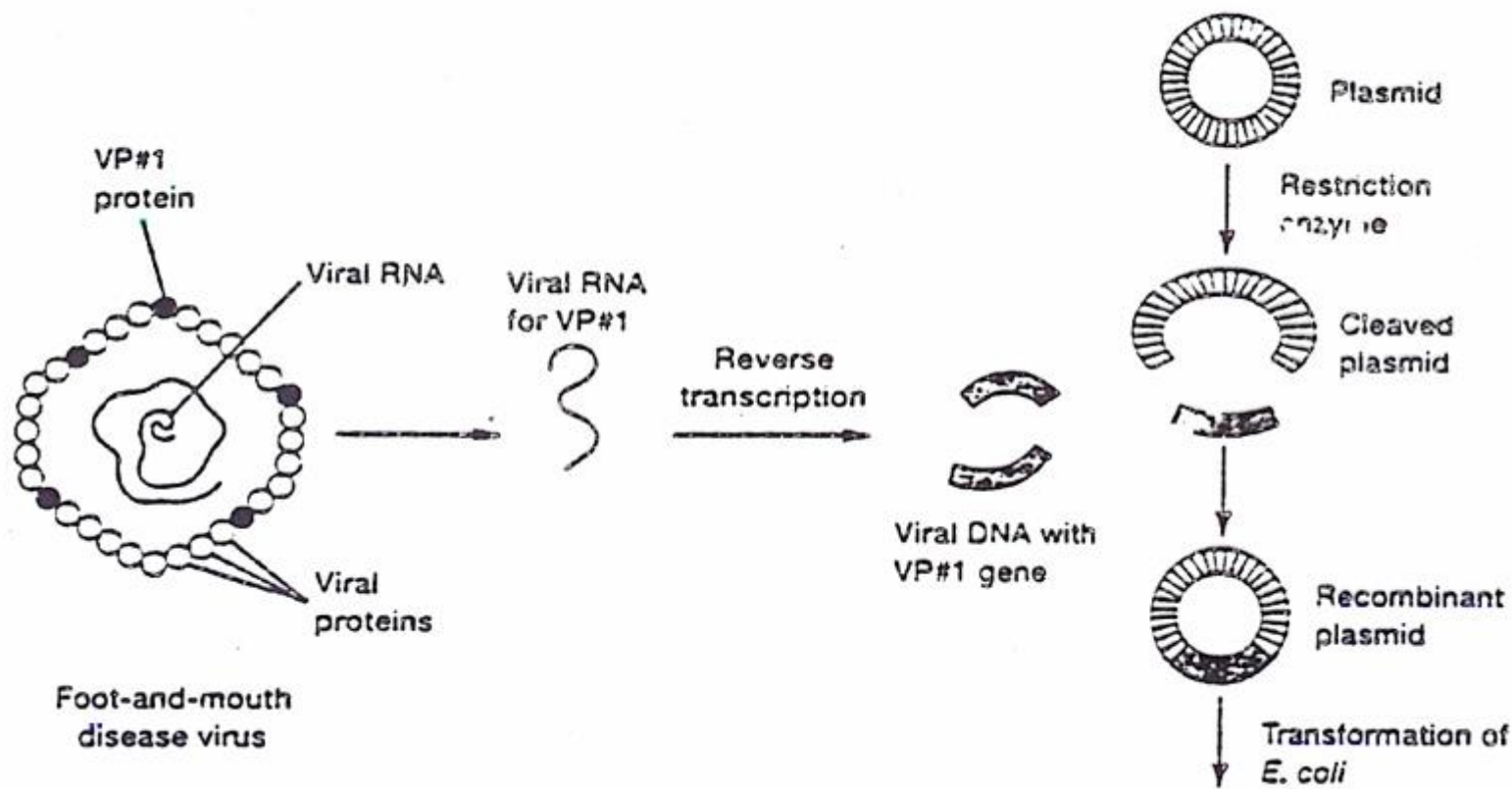


Foot-and-mouth  
disease virus



# SZKF VAKCINA

Az SZKF burokfehérje gén klónozása *E. coli* plazmidba:





# SZKF VAKCINA

Az SZKF burokfehérje gén klónozása *E. coli*-ba:

Kifejeződik, de intracelluláris, és zárványtestet képez →

- Sejtfeltárás
- Szolubilizálás (feloldás)
- Folding („hajtogatás”)

után jöhet csak a szokásos tisztítás, feldolgozás

