

MÁSODLAGOS ANYAGCSERETERMÉKEK = SZEKUNDER METABOLITOK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Szekunder metabolitok

Metabolitok: az anyagcsere során keletkező kis méretű közti- és végtermék molekulák.

Az anyagcserét és a metabolitokat két csoportra (elsődleges = primer és másodlagos = szekunder) osztják.

Az elsődleges anyagcsere folyamatai és molekulái közvetlenül részt vesznek a normális növekedésben, létfenntartásban és energiatermelésben (anabolizmus és katabolizmus). Hiányukban az élőlény általában elpusztul.

A másodlagos anyagcsere folyamatai és molekulái nem vesznek részt közvetlenül ezekben a folyamatokban, célszerűségük, hasznosságuk nehezen értelmezhető. Nem létfontosságúak, megjelenésük csak bizonyos életszakaszokban jellemző.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Szekunder metabolitok

... a másodlagos anyagcsere termékei, amelyek az elsődleges anyagcsere termékeiből kedvezőtlen (pl. tápanyaghiányos) körülmények között, a növekedés késői, korlátozott fázisában képződnek.

A primer és szekunder metabolizmus közötti kapcsolatot a kulcsenzimek, „átjárók” jelentik, mennyiségük és aktivitásuk szabályozza a szekunder metabolitok termelését. → génmanipulációt ezeken érdemes végezni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Szekunder metabolizmus

Szénforrás szabályozás: katabolit represszió – ha bőségesen van hozzáférhető C-forrás, akkor az elsődleges anyagcsere pörög, nincs termékképzés. →

- glükóz limit (adagolás apránként), vagy
- lassan metabolizálható C-forrás, pl. poliszacharidok (keményítő, dextrin), laktóz, növényi olajok.

Nitrogén szabályozás: változó, de a sok N általában a növekedésnek kedvez → elsődleges anyagcsere

- Az ammónium sók gyakran represszálják a termékképzést, inkább szerves N-forrás (szójaliszt, kukoricalekvár)
- fed batch – adagolással alacsony szinten tartani a koncentrációt.



Szekunder metabolizmus

Foszfor szabályozás:

- befolyásolja mikroba növekedési sebességét, anyagcseréjét, szénhidrát égetésének sebességét
- bizonyos koncentráció felett negatívan szabályoz, (hozzájárul a gyors C égetéshez)
- túl nagy koncentrációja a szintetáz enzimek képződését gátolja

→ alacsony indulási P koncentráció, csak annyi, hogy a szaporodási szakasz végére elfogyjon.

Enzim indukció:

- A kulcsenzimek némelyike indukálható speciális tápanyaggal pl: metionin → cephalosporin



TUMORELLENES BIOTECHNOLÓGIAI HATÓANYAGOK



A DNS-RE HATÓ (RÁKELLENESES) METABOLITOK

Közös tulajdonságok:

- citosztatikusak (humán sejtek osztódását gátolják)
 - a DNS-sel lépnek kölcsönhatásba valamilyen módon
 - gyorsan osztódó szövetekre hatnak elsősorban, ezért a daganatokon kívül károsítják:
 - a vérképző szerveket - ivarsejteket
 - hajhagymákat - nyálkahártyákat
 - immunrendszert (az idegsejteket nem!)
 - terápiás indexük (legkisebb mérgező adag/legkisebb hatásos adag) alacsony
- A hatás szerinti csoporton belül 5 fő szerkezeti csoport



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

AKTINOMICINEK

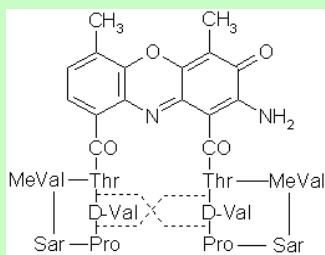
Szerkezet: fenoxazin-ciklopeptidok, H-hidak stabilizálják

MeVal = metil-valin

Sar = szarkozin

Tulajdonságok:

- oxigén-, szabad gyök-fény- és hőérzékeny
- oldhatóság: vízben, alkoholban jó, éterben rossz
- színesek (ez itt vörös)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

AKTINOMICINEK 2.

Bioszintézis: a ciklopeptidok tiotempláton képződnek, az alapváz a triptofán bomlástermékeiből indul, két egyforma aromás vegyület dimerje.

Gyártás: fermentáció, de különleges intézkedésekkel. Az anyag nagyon toxikus, pora vagy aeroszolja belélegezve, vagy a bőrön át is ártalmas. Az egész folyamatot, a feldolgozást is beleértve teljesen zárt rendszerben hajtják végre (CONTAINMENT). A legvégén, ahol már nem lehet zárni, a dolgozók „ürhajós” védőruhában dolgoznak.

Toxicitás: vörös csontvelő, gyomor és béltünetek, vesekárosítás. Reverzibilis.

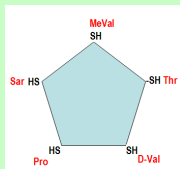
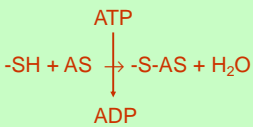


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

A ciklopeptid antibiotikumok bioszintézise

NEM-riboszomális fehérjeszintézis, a peptid egy multienzim komplex (**tiotemplát**) felszínén képződik. Annyi kötőhely van, ahány aminosav kapcsolódik. Minden kötőhely specifikusan felismeri a megfelelő aminosavat, és egy -SH csoporton **tio-észter** formában köti meg (ATP igény, aktiválás), majd az aminosavak között létrejön a peptidkötés.



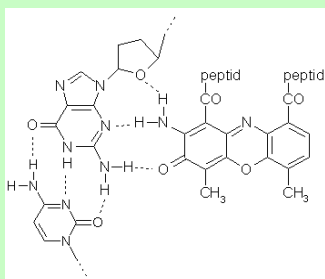
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

AKTINOMICINEK 3.

Támadáspont: a DNS-re kötődik, két egymás melletti guanin közé, sok H-híddal. Gátolja a kiírást, kis koncentrációban a mRNS szintézist, nagyobbban a DNS másolást

Az alapváz a guaninokkal párhuzamosan áll ↓

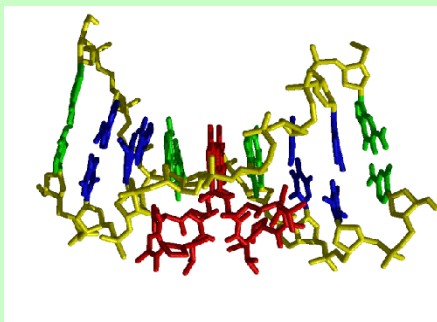


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

AKTINOMICINEK 4.

Zöld: G-C pár
Kék: A-T pár
Piros: aktinomicin
Sárga: cukorfoszfát lánc

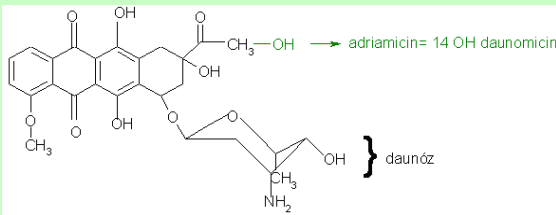


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

ANTRACIKLINEK (daunomicin, adriamicin = doxorubicin)

Str. peuceoticus, (1963, 1969)
Szerkezet:



13

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ANTRACIKLINEK 2.

Tulajdonságok:

- > vörös kristályos anyag
- > hidrokloridját (.HCl) hozzák forgalomba (aminocukor)
- > maró, hólyaghúzó anyag
- > kémiai módosítással létrehozott származékainak hatása mind gyengébb

Bioszintézis:
A tetraciklinekkel analóg poliketid típusú bioszintézis

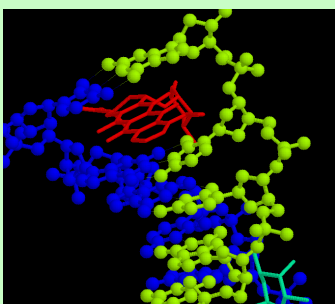
Előállítás:
fermentációval

14

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ANTRACIKLINEK 3.

Hatás:
A DNS láncok közé ékelődik, a cukor a deoxiribózfoszfat láncokhoz köt. 60-100 bázispáronként talál egy alkalmas kötődési helyet.



15

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

ANTRACIKLINEK 4.

Hatás: a rákötődött antraciklinek sok enzim hozzáférését akadályozzák:

- Polimerázok: gátolja az átírást RNS-re, DNS-re, különösen az rRNS-re
- DN-ázok: a DNS „túl stabil”, nem bontható
- Topoizomerázok: a topoizomerázok a replikáció során elvágják, majd összeligálják a DNS egyik szálát, ezzel is akadályozza a duplikációt.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

ANTRACIKLINEK 5.

Hatásspektrum:

leukémia, szarkómák, Hodgkin-kór, neuroblastoma, stb.

Toxicitás:

- az általános + szívelégtelenség (tachycardia, arhythmia, stb)
- ha a bőrre kerül, hólyaghúzó hatású (másodfokú égéshez hasonló tünetek: hólyagok stb.)
- az Adriamicin kevésbé toxikus

Felhasználás:

infúzióban, erősen hígítva (mert az érfalat is károsítja)

Terápiás indexe kicsi



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

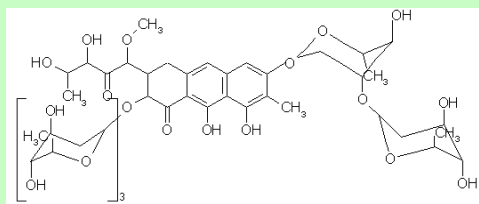
17

CHROMOMICINEK

MITRAMICIN (*Str. argillaceus*, *Str. tanashiensis*, 1962)

OLIVOMICIN (*Str. olivoreticulii*, 1962)

Szerkezet: az aglikon (cukor nélküli rész) = chromomicin + 5 db mikaróz



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

CHROMOMICINEK 2.

Tulajdonságok:

- sárga, kristályos anyag - pH = 4 alatt hidrolizál
- kétértékű ionokkal kelátot képez, a vas-kelátja oldhatatlan, ezért biológiailag inaktív, a Ca- és Mg-kelát oldható

Hatásspektrum:

- malignus hypercalcaemia ellen → leviszi a kalcium szintet
- zavarja a véralvadást is

Toxicitás:

- az általános + máj- és veseműködési zavarok

Felhasználás:

- infúzióban, erősen hígítva



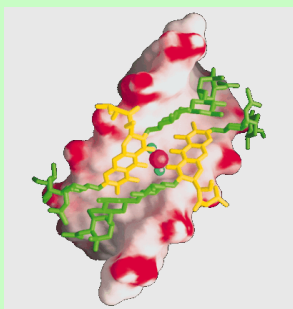
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

CHROMOMICINEK 3.

Támadáspont:

- Komplexet képez a DNS-sel: két DNS spirál, Mg²⁺, + mitramicin dimer →
- Az aglikon a guaninhoz, a cukrok a foszfátlánchoz kötődnek,
- Gátolja a transzkripciót DNS-re és RNS-re egyaránt, de a reverz transzkriptázokat nem



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

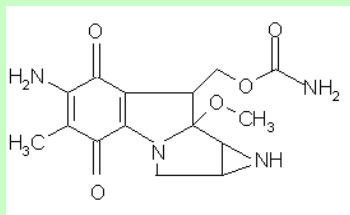
MITOZÁNOK

MITOMICIN C (*Str. caespitosus*, 1956)

Szerkezet: (ezt hozzák forgalomba, de ez még nem aktív)

Tulajdonságok:

- vörös, kristályos anyag
- bomlékony, oxidáló hatásra, fényre érzékeny
- alkoholban jól oldódik, vízben alig



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

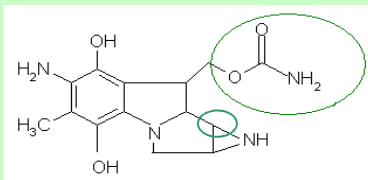
A MITOMICIN AKTIVÁLÁSA

Szöveti enzimek aktiválják, szelektív, kettős alkilezőszerré válik.

Toxicitás: általános + bőrképzést okoz

Alkalmazás:

emésztőcsatorna rákjai, pikkelysömör, melanómák (veszélyes áttételek) ellen
Intravénás injekcióban

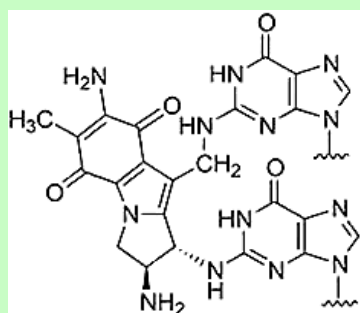


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

A MITOMICIN KÖTŐDÉSE

A DNS két, külön szálon fekvő guaninjával reagál, kovalens keresztkötéseket hoz létre.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

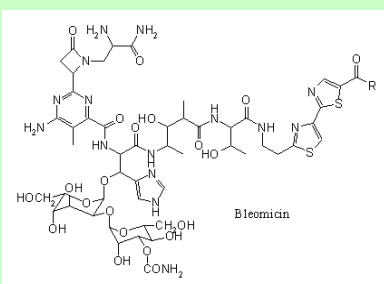
BLEOMICINEK

Str. verticillus, 1956

Szerkezet: szokatlan aminosav-származékokból áll

Tulajdonságok:

- krémszínű kristályok
- higroszkópos
- vízben jól oldódik
- redox érzékeny (SH vegyületek, H₂O₂, aszkorbinsav, nehézfémionok inaktíválják)

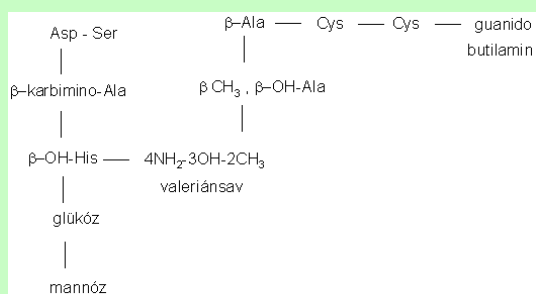


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

BLEOMICINEK 2.

Bioszintézis:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

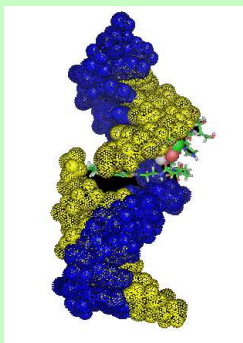
BLEOMICINEK 3.

Hatás:

- Beilleszkedik a DNS kettős spirál kisebbik hajlatába
- Gátolja a timidin beépülését a DNS-be
- Jelenlétében a DNS fragmentálódik

Alkalmazás:

- csak parenterálisan
- nincs immunosuppresszív hatása, mert a nyirokszövetek enzimei lebontják



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

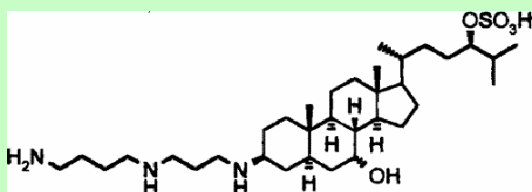
SQUALAMIN

1992-ben izolálták a *Squalus acanthias* (cápa fajta) májából

Tulajdonságok:

vízoldható, ellenálló molekula, nem boldékony

Szerkezet: szteránváz, ikerionos



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

SQUALAMIN 2.

Bioszintézis:

epealkoholokhoz hasonló, poliamin módosítással, prekursoroként szerepelhetnek a szteroidalkoholok.

Előállítás: szintetikusan

Hatás:

Közvetlenül gátolja az endothel (érfal) sejtek aktivációját, mozgását és szaporodását, így a tumor vérellátását csökkenti (a tumornak a gyors szaporodáshoz megfelelő vérellátással kell rendelkeznie)
mikroba-, tumor-, angiogenezis- (érfal regeneráció, különböző növekedési faktork hatására) gátló hatású



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

SQUALAMIN 3.

Hatásspektrum:

Gliómák (agydaganat), kóros érfalnövekedés okozta betegségek (rák, diabeteszes retinopátia (vaksághoz vezethet), fibrodysplasia ossificans progressiva (genetikai betegség: a nagyobb izmokban folytatódik a csontok képzése ez mozgáskorlátozottsághoz vezet), tüdőrák, petefészekrák, egyéb tumorok, melanóma, emlő-, agyi tumorok

Felhasználás/Alkalmazás:

Kemoterapikumokkal (pl. Cytosan) kombinálva



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

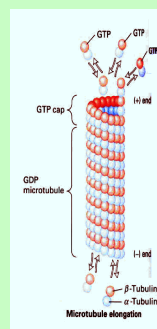
29

MIKROTUBULUSOKRA HATÓ TUMORELLENES SZEREK

A mikrotubulus kb. 25 nm vastag üreges képződmény, egy jobbmenetes rövidmenetű és egy balmenetes hosszúmenetű helixből áll. Alapegysége, a tubulin nem egységes, megkülönböztetünk α - és β -tubulint, ezek heterodimer párt alkotnak.

Molekulásúlya kb. 50 kD

A polimerizáció-depolimerizáció egyidejűleg folyik, kémiaiilag GTP és Mg^{2+} szükséges hozzá. 37°C körül a polimerizáció, míg alacsonyabb hőmérsékleten a depolimerizáció a jellemző.

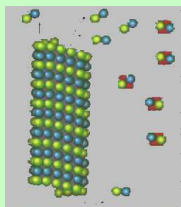
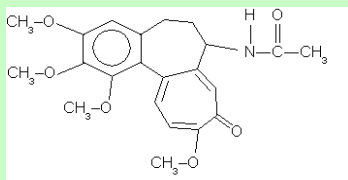


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

A MT POLIMERIZÁCIÓT BEFOLYÁSOLÓ SZEREK

Colchicin: őszi kikericsből (*Colchicum autumnale*) izolálható antimitotikum; a MT polimerizációt gátolja. Gyógyszer, de tumorok ellen nem alkalmazzák túlságosan erős mellékhatásai miatt. Kis adagokban köszvény és reuma ellen adják. In vitro kísérletekben bevált inhibitor. Ültetvényeken természetik, magját extrahálják.

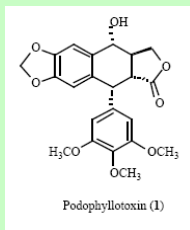


31

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

PODOFILLOTOXIN

Podofilotoxin: a amerikai mandragora (*Podophyllum peltatum*) rizómájában található lignán



Kompetitív a tubulinkötésben a kolhicinnel, de nem pontosan ugyanoda köt, inkább szterikus átfedés van.

Egyéb hatásai: hánytató, bőrizgató, szemölcsirtó

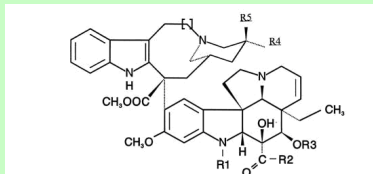


32

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

VINCA ALKALOIDOK

Rózsameténgből (*Cathartus roseus*, régi nevén *Vinca roseus*) származó **vinchristin**, **vinblastin**, és ezek szintetikus származékai; MT polimerizációt gátló antimitotikus szerek.



	R1	R2	R3	R4	R5	[]
vincristine	CHO	OCH ₃	OCOCH ₃	CH ₂ CH ₃	OH	-
vinblastine	CH ₃	OCH ₃	OCOCH ₃	CH ₂ CH ₃	OH	-

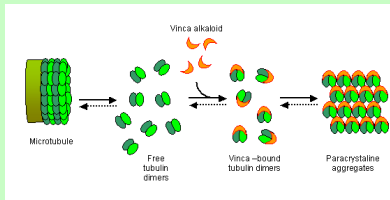
33

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A VINCA ALKALOIDOK HATÁSA

A vinca alkaloidok sejtspecifikus ágensek, melyek az osztódó sejteket blokkolják a mitózis folyamatában (metafázisban).

Specifikusan képesek a tubulinhoz kötődni, a heterodimer tubulin béta egységével irreverzibilisen asszociátumot képeznek. Ettől a dimerek összekapcsolódva nem spirált alkotnak, hanem „kikristályosodnak”. Húzófonalak hiányában a sejt osztódása megáll.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

A VINCA ALKALOIDOK ALKALMAZÁSA

Alkalmazás: limfómák, tüdőrák, áttételes tumorok esetén.

Mellékhatások: az általános, + a vinkrisztin esetében idegrendszeri tünetek.

A gyógyászati alkalmazásuk során főleg intravénásan, infúzióban adagolják (szulfátsók formájában). Jelentős szövet-irritáló hatásuk van.

Metabolizmusuk főleg a májban megy végbe. Számos metabolitját azonosították, mindegyiknek csökkent a biológiai aktivitása.

Kiürülés: kb. 24 óra alatt, a vinchristin eliminációja lassabb Adagját testfelületre számolják ki (mg/m²)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

35

A VINCA ALKALOIDOK ELŐÁLLÍTÁSA

A vinblastin és vinchristin mennyisége a *Cathartus roseus*-ban kicsi, mindössze 0,0005%, ezért az extrahált termék ára magas.

Más utak:

Növényi szövettenyésztés: kalluszban és szuszpenzióban is működik, de rossz kihozattal.

Legység kapcsolat: A vinblastin két monomer egységből épül fel, a catharantinból és a vindolinból. A vindolin koncentrációja a *C. roseus*-ban kb. 0,2%, jóval nagyobb, mint a catharantiné. Tehát célszerű a vindolint a növényből extrahálni, és catharantint szövettenyésztésben előállítani, majd ezeket enzi-mes, vagy kémiai úton összekapcsolni.

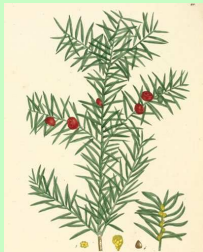


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

36

TAXOL

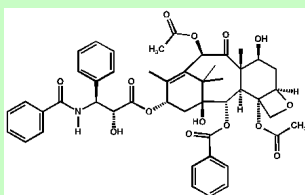
Taxol: az oregoni tiszafa (*Taxus brevifolia*) kérgéből izolálható; MT stabilizáló antimitotikum



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

A TAXOL TULAJDONSÁGAI



Vízben rosszul oldódik, szerves oldószerekben jól. A szervezetbe ezért emulzióban viszik be.

Alkalmazása: petefészek-, méh- és emlődaganatok, agyi tumorok, tüdőrák.

Hatása: sztöchiometrikusan kapcsolódik a beépült tubulinhoz, azaz nem a mikrotubulusok felépülését, hanem lebomlását akadályozza. Kombinálható a polimerizációgátlókkal.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

A TAXOL ELŐÁLLÍTÁSA

A természetes források nagyon korlátozottak, mert a tiszafa igen lassan nő (több száz év), és a kérgében nagyon kis mennyiségben (50-150 mg/kg) fordul elő a taxol, a tűlevelében még kevesebb, 15-50 mg/kg van. Egy beteg kezeléséhez három öreg tiszafát kellene feldolgozni.

Alternatív eljárások:

- félszintézis más taxánvázis anyagokból
- totálszintézis: megoldható, de drága (négy C*)
- tűlevelek extrakciója (megújul, nem kell a fát kivágni)
- növényi szövettenyésztés

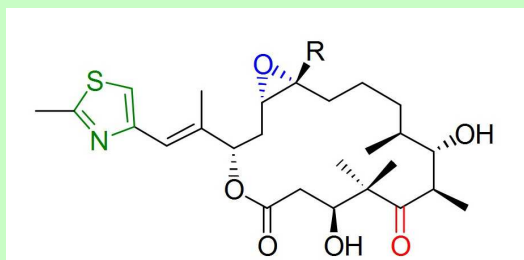


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39

EPOTILON(ok)

EPOxy + TlazoL + ketON = EPOTILON



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

EPOTILON(ok)

1987-ben fedezték fel, egy talajbaktérium, a *Sorangium celulosum* (*Myxobacteria*) termeli.
(De heterológ expresszióval más törzsekkel is lehet termeltetni.)

Erős citotoxikus hatása van az eukariótákra – a *Mucor* fajokra és az állati sejtekre.

Makrolakton = nagy (16 tagú) gyűrű,
lakton = a gyűrű intramolekuláris észterkötéssel zárul.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

HATÁS

A hatásmechanizmus teljesen analóg a Taxollal.
A már beépült tubulinhoz kapcsolódik, a mikrotubulusok lebomlását akadályozza. Ezzel megállítja a mitotikus sejtosztódást, a sejtciklus megakad, a sejtek elpusztulnak.

Ugyanazon a ponton kötődnek, kompetitíven leszorítják egymást.

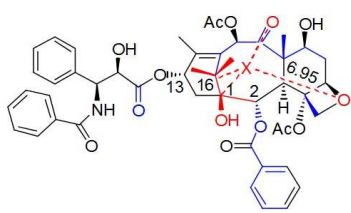
A két molekula hasonlósága ábrán is bemutatható:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

SZERKEZETANALÓGIA



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

HATÁS

Az azonos hatásmechanizmus mellett az epotilonoknak több előnye is van a Taxollal szemben:

- Jobb a vízoldhatóságuk, ezért nem kell segédanyagokat alkalmazni
- Egyszerűbb a szerkezetük, könnyebb előállítani és származékot képezni.
- Kevésbé károsítja a makrofág sejteket
- Kisebb koncentrációban hatékony →
- Több taxol-rezisztens tumor sejtvonal ellen is hatásos



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

IN VITRO HATÉKONYSÁG
IC50 értékek (nM)

Cancer Cell Line	Epo A	Epo B	Taxol
A549 (Lung)	2.67	0.19	3.75
T-24 (Bladder)	3.77	0.25	4.40
MCF-7 (Breast)	1.49	0.42	2.53
MCF-7/ADR (Breast, MRM/MDR)	27.50	2.92	9105
PC-3M (Prostate)	4.27	3.8	6.71
HCT-116 (Colon)	2.51	0.42	1.96
A-431 (Epidermoid)	2.35	0.26	1.66
KB-31 (Epidermoid, parental)	2.10	0.71	2.90
KB-8511 (Epidermoid, MDR)	1.90	0.89	994
1A9 (Ovarian, parental)	2.00	0.06	5.11
1A9PTX-10 (Ovarian, tubulin mutation)	-	18.4	82.5



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45

BIOSZINTÉZIS

A *Sorangium cellulosum* 2:1 arányban termeli az A és B molekulát.

Sok lépésű bioszintézis, három fő szakaszának moduljai (gén/enzimszop):

- Egy nem-riboszomális peptid szintetáz (ciszteiből és Ac-CoA-ból létrehozza a tiazol gyűrűt)
- Kilenc poliketid szintetáz egység (létrehozza a szénláncot)
- Egy citokróm P450 monooxigenáz (epoxidálás)

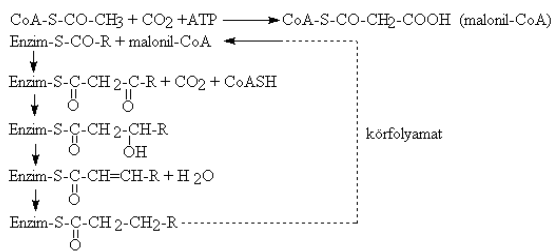


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

POLIKETID BIOSZINTÉZIS

= a zsírsavszintézis reakciói:



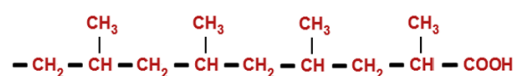
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

POLIKETID BIOSZINTÉZIS

A szekunder metabolizmusnál nem mindig megy végig a redukció, hanem valamelyik lépcsőn megáll (=O, -OH, C=C).

Ha Ac-CoA helyett propionil-CoA épül be, abból köztitermék-ként metil-malonil-CoA lesz, ami összeépülve metil-csoportokat eredményez a szénláncban („szögcső” szerkezet):



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

EPOTILONok

Az in vivo kísérletek (egér, klinikai) eredményei nem olyan jók, mint a sejtvonalakkal mértek.
Prosztata tumor esetében jó eredmények.
Nagyon kicsi a terápiás index (káros dózis/hatásos dózis), problémás az adagolás.
Több származékot állítottak elő és vizsgálnak, ezek közül néhány a klinikai II és III fázisban van.

Jó helyettesítője/kiegészítője a taxolnak, de még dolgozni kell rajta.