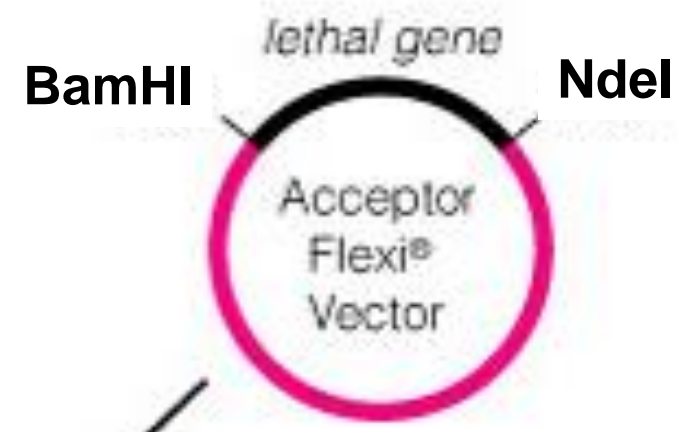
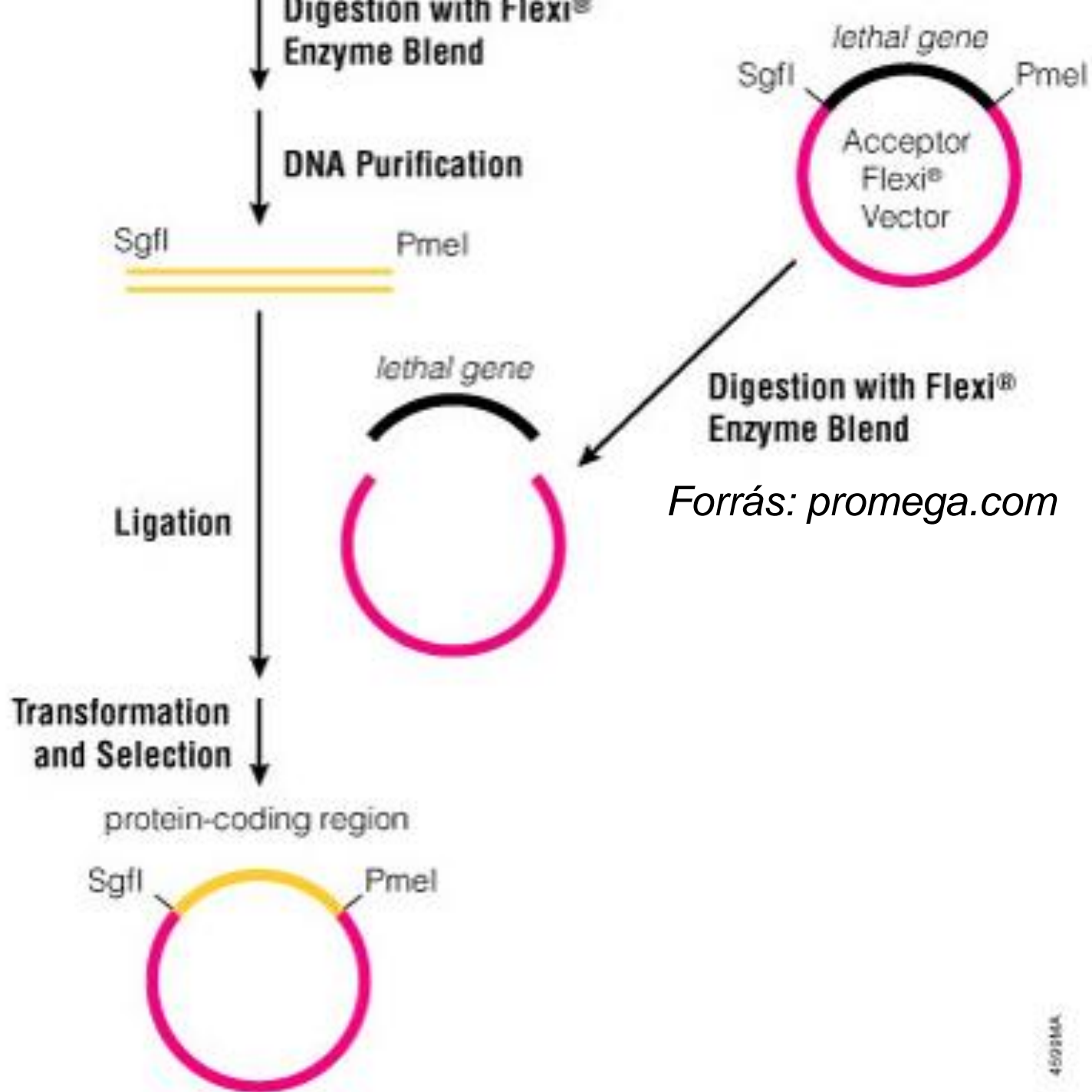


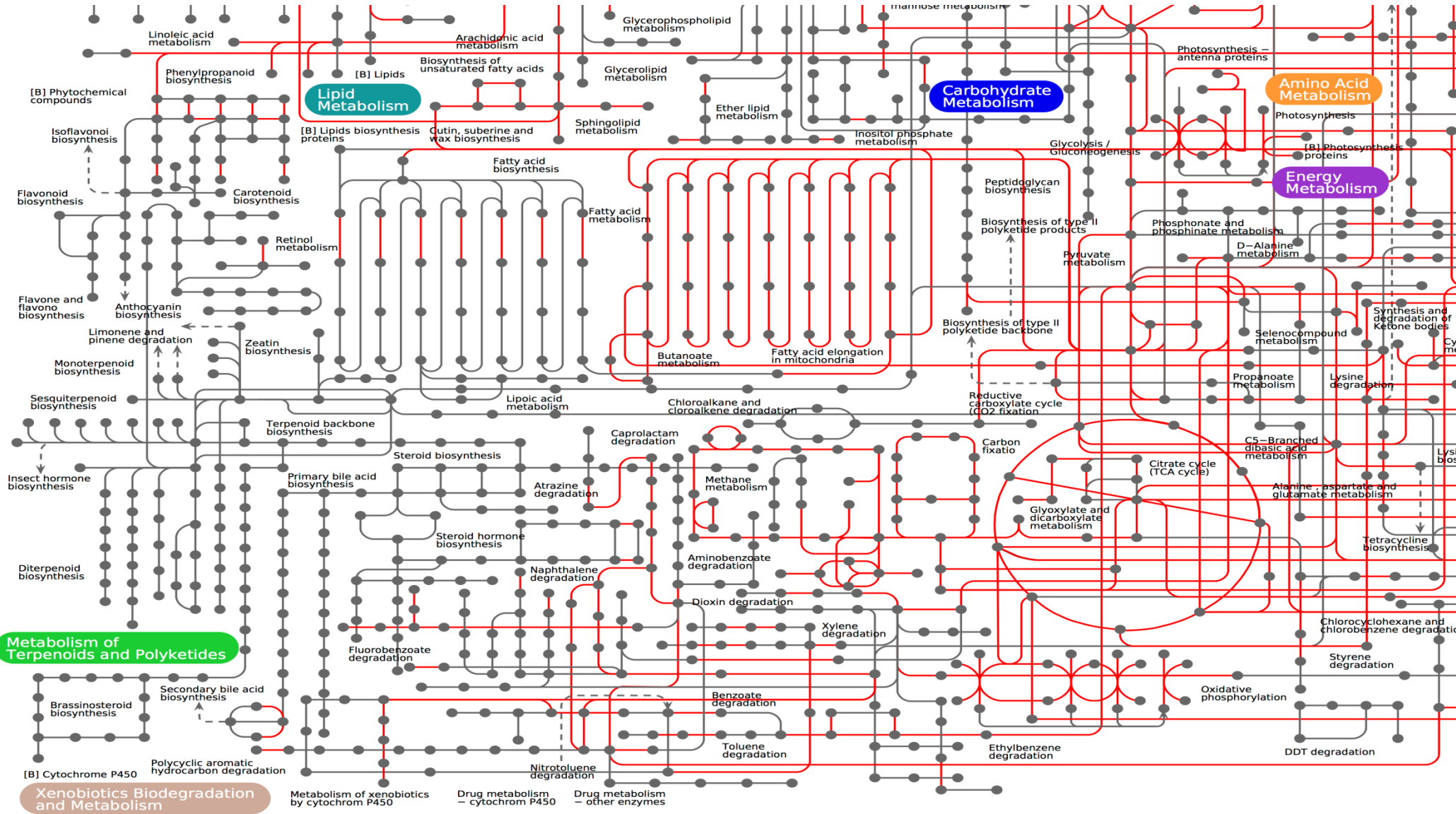
- A primerek végére restrikiós enzim hasító helyeket tervezünk.
- Ezek „ragadós végekként” fognak szolgálni a vektorba való beillesztéshez.
- A felnyitott vektoron a primerek végeivel komplementer „ragadós végek” lesznek megtalálhatóak, ha ugyanazzal a két restrikiós enzimmel hasítottunk ki belőle egy DNS darabot.

Miért két enzimmel hasítunk?





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



4. GÉNMANIPULÁLT MIKRO-ORGANIZMUSOK

A biotechnológiai ipar termékei:

- **Elsődleges anyagcseretermékek**

Amelyek bioszintézise közvetlenül kapcsolódik a sejt energiatermeléséhez, vagy növekedéséhez

- **Másodlagos anyagcseretermékek**

Amelyek bioszintézise nem kapcsolódik a sejt energia-termeléséhez, 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.



4.1. 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.

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

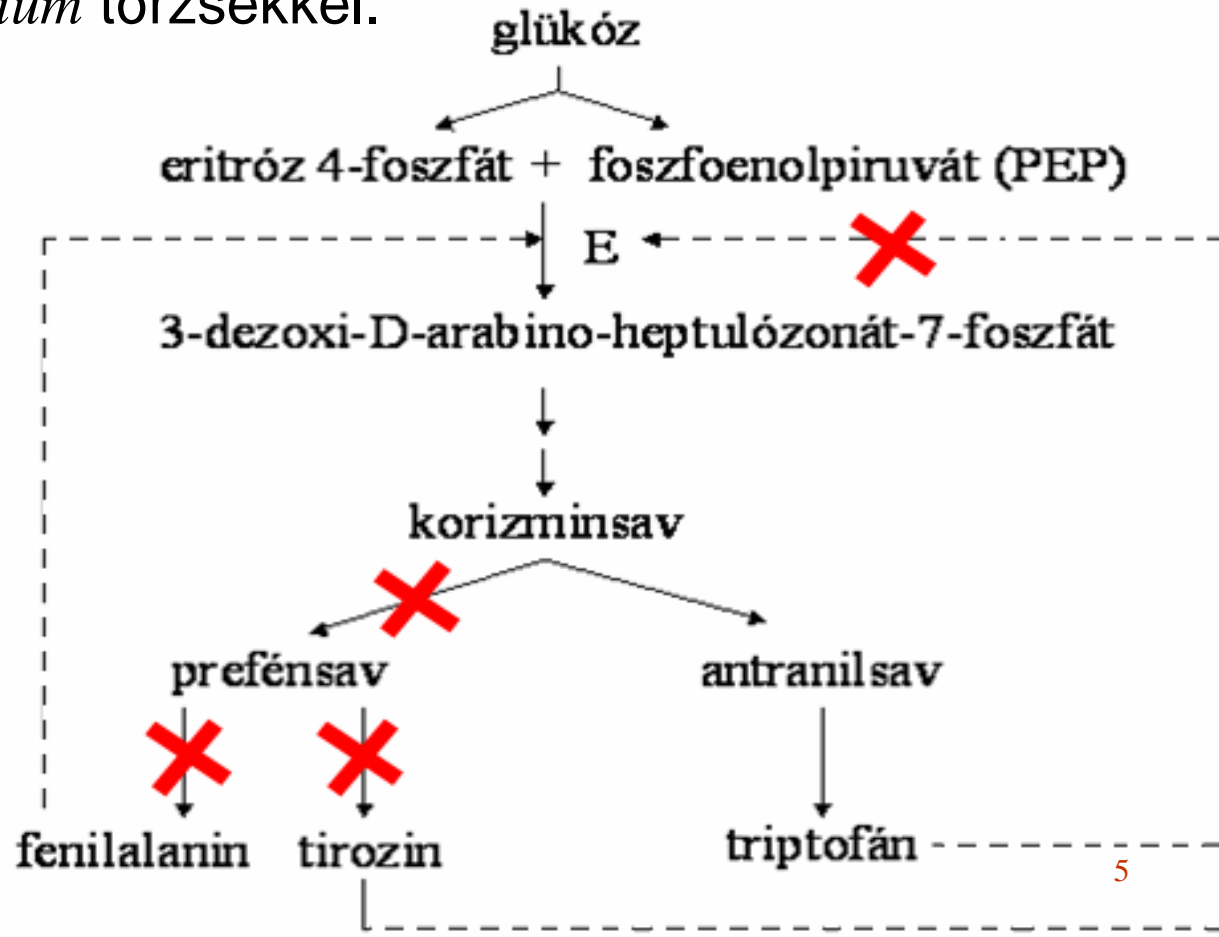
Anyagcsere-mérnöki szelekció ipari mennyiség termeléséhez:

Auxotrófiák:

Phe^r, Tyr^r,

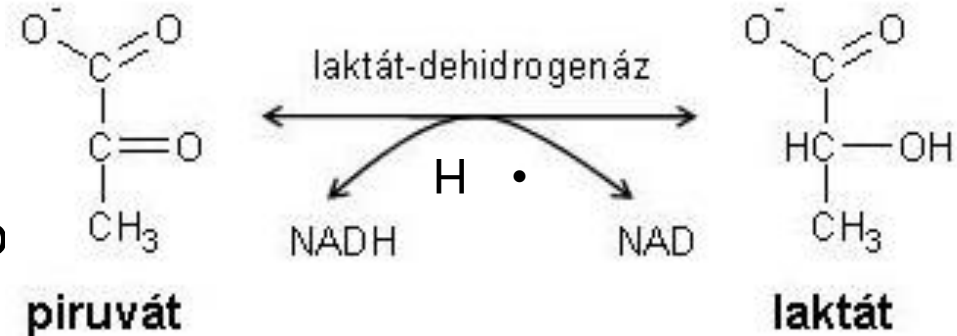
Rezisztencia:

5-Me-Trp^r



Másodlagos anyagcsere termékek

- Termelődésük nem kapcsolódik közvetlenül a sejt energiatermeléséhez vagy növekedéséhez,
- csak **kedvezőtlen körülmények hatására** indul be.
- Nem a termék a fontos a sejt számára,
- hanem a képződéséhez vezető reakció
- Ezek révén tud a sejt valamilyen, számára nem optimális anyagot átalakítani vagy attól megszabadulni.



Példa az emberi sejteknél: tejsav termelés megfeszített izommunka mellett. A tejsav azért képződik, mert O₂ hiányában a sejt nem képes megfelelő mennyiségben a mitokondrium elektron transzport láncának átadni az elektronokat, így ezek ebben a formában „tárolódnak”.



4.2. Másodlagos anyagcsere-termékek: például színyanyagok vagy antibiotikumok

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

Antibiotikumok: mikroorganizmusok által termelt 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 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



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*)



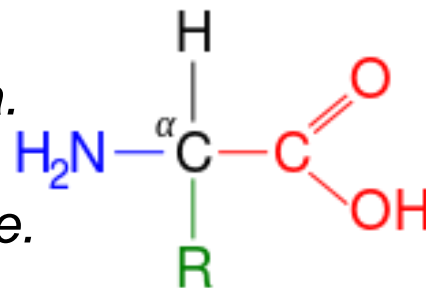
Példa: penicillin (csoport)

①

②

Jobbra: aminosavak általános szerkezete.

Forrás: Tim Vickers, Yassine Mrabet, Wikipedia.



Lent: 6-aminopenicillánsav általános szerkezete.

Szerkezet: alapváz: 6-amino-penicillánsav
két aminosavból tevődik össze, cisztein + valin

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

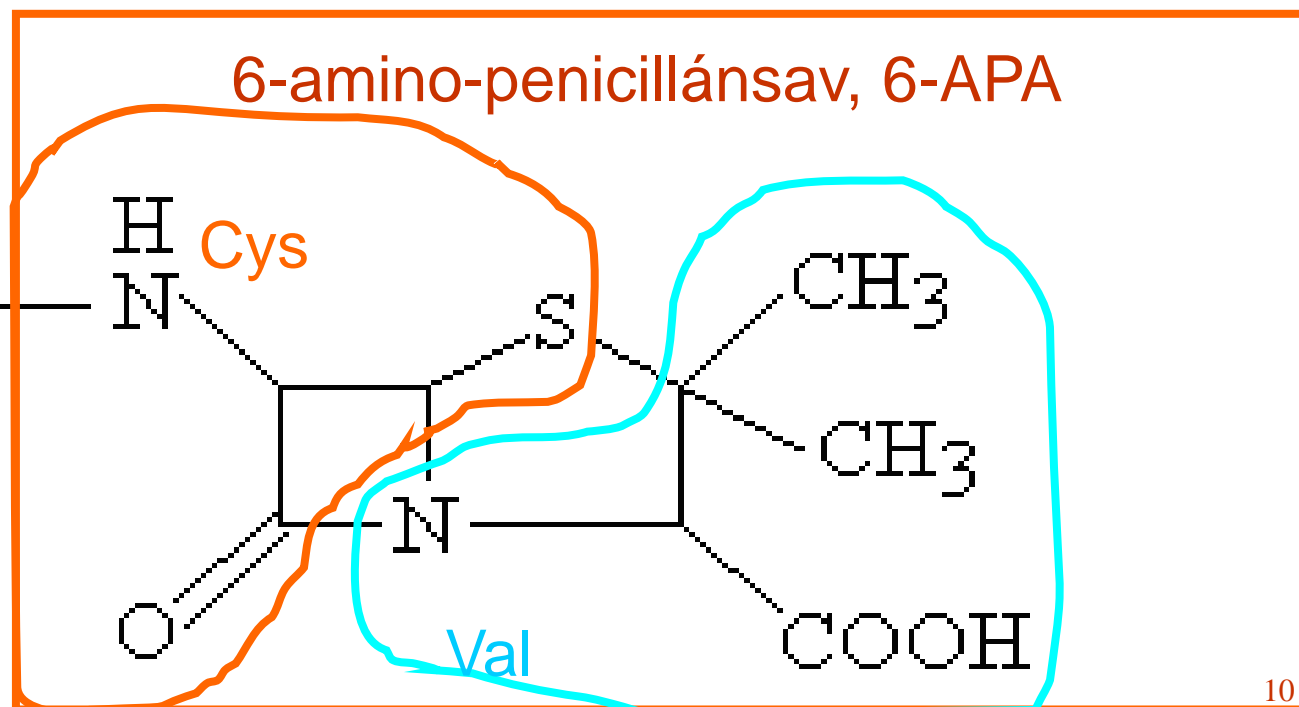
R = bármilyen csoport.

Ebben különböznek egymástól a penicillin molekulák.

Cys = cisztein

Val = valin

Ez 2 aminosav a 20 fehérjealkotó közül.



A penicillin tulajdonságai

BOMLÉKONY! Savak, lúgok és enzimek hatására többféle reakcióban is gyorsan bomlik – a gyomorsavtól is meg kell védeni.

Az R oldallánc lecserélésével tudtak **savtűrő penicillint** létrehozni. 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 = 0,6 µg G-penicillin Na sónak felel meg.



G-penicillin/benzil-penicillin

Az R oldallánc eredetileg a fenil-ecetsav.

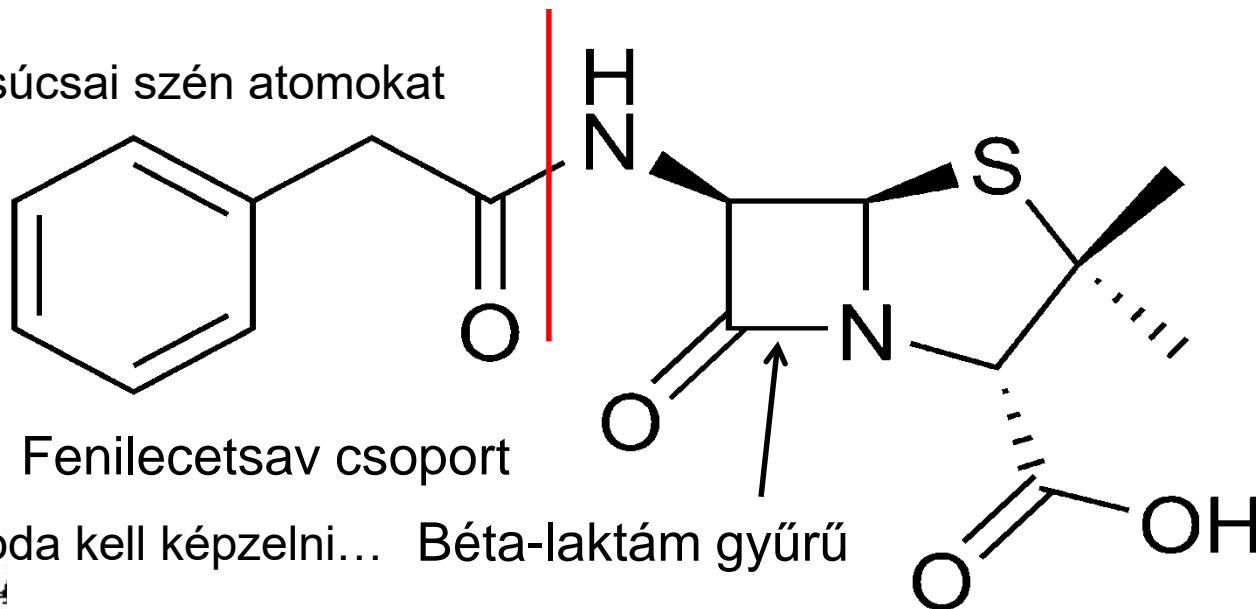
A G-penicillin a fermentált alapmolekula (ezt csinálja a penész), ebből gyártják a többit.

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.

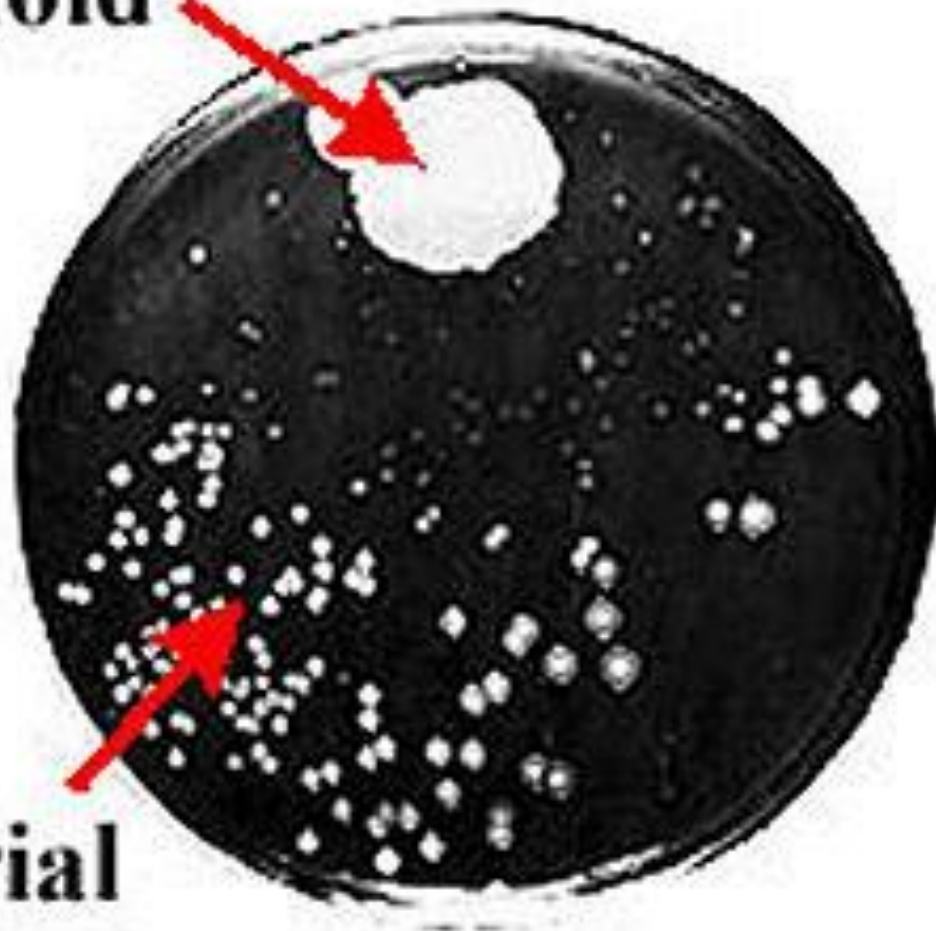
A hidrogéneket oda kell képzelni... Béta-laktám gyűrű



Fleming's original plate:

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**



A penicillin gyártás fejlesztése

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)
- Tápoldatoptimalálás
(cukorlimit, C/N, Fe ion)
- Levegőztetés, reaktor
- Szabályozások (pH, t)

Ezek optimalizálási feladatok...



Törzsnemesítés

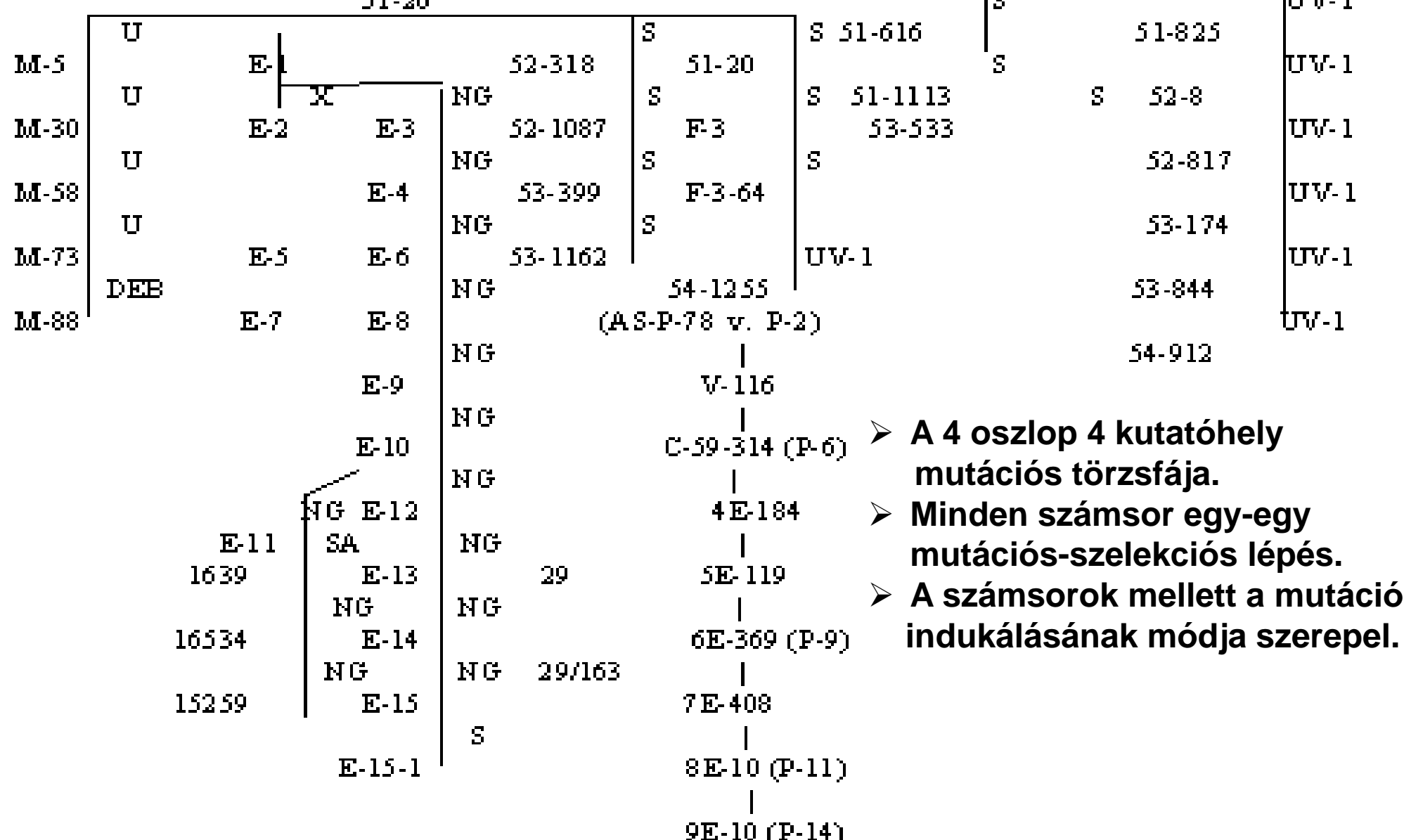
Célok:

- 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 Panlabs Seattle Univ. Wisconsin Madison
 West Chester

Ak alkalmazott módszerek: S= szelekció, X= röntgenbesugárzás, UV= ultravioleta 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 tápanyag-ellátás 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 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...

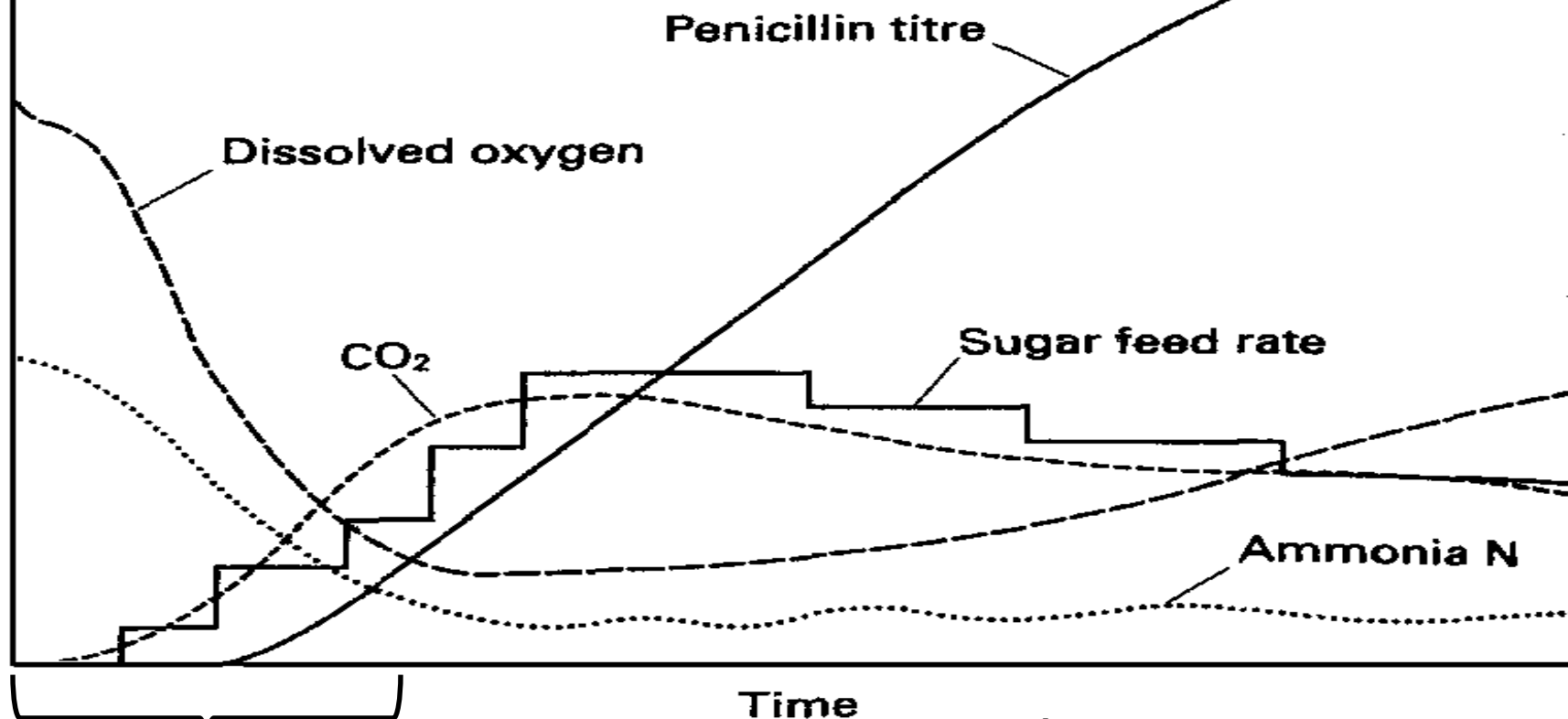
Tápanyagellátás a második szakaszban:

- 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).



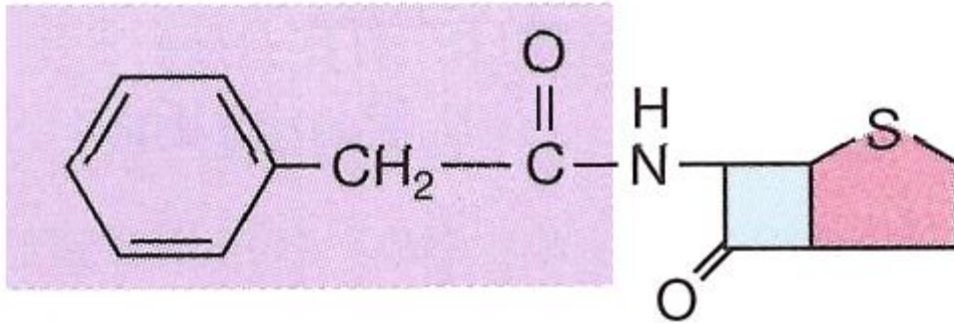
1. szakasz: sejtszaporodás. Nagy mennyiségű nitrogén és oxigén fogyasztás (aerob anyagcsere).

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

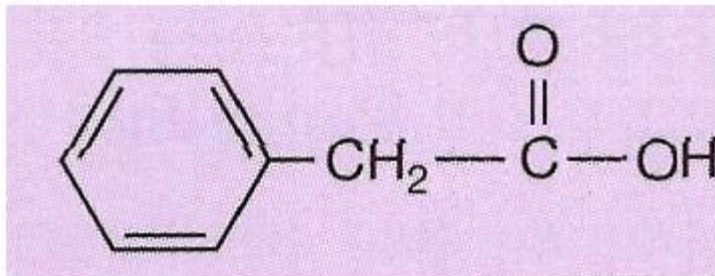
Prekurzor

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 tartománya van: 2-4 g/l.



G penicillin



Fenil-ecetsav



Félszintetikus penicillinek

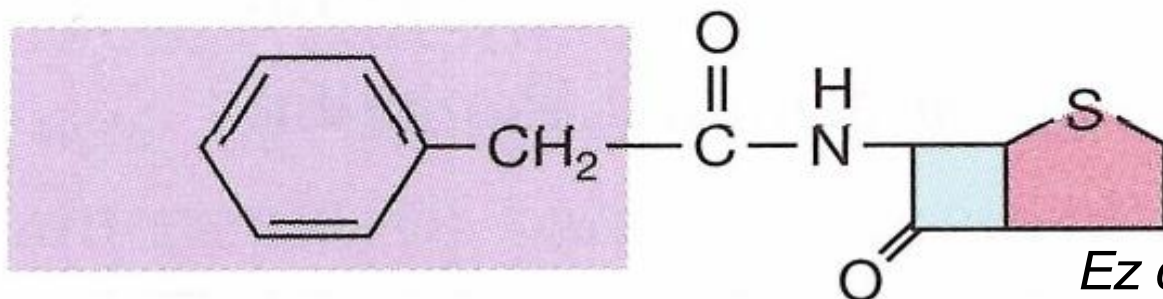
Az alapmolekulát a mikroorganizmus állítja elő, de ehhez szintetikusan (szerves kémiai úton) olyan oldalláncot kapcsolnak, amelyre fermentációs úton nincs lehetőség.

A fermentált alapvegyületek:

Natural penicillins

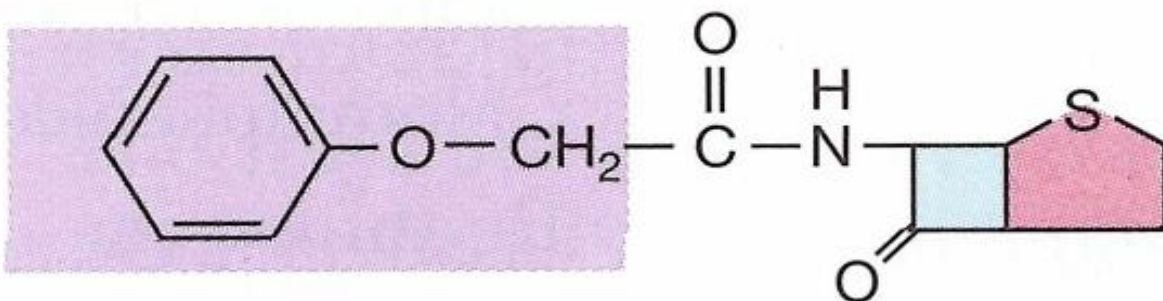
Fejlesztés hajtóereje pl.:

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



Penicillin G
(Gram-positive cocci)

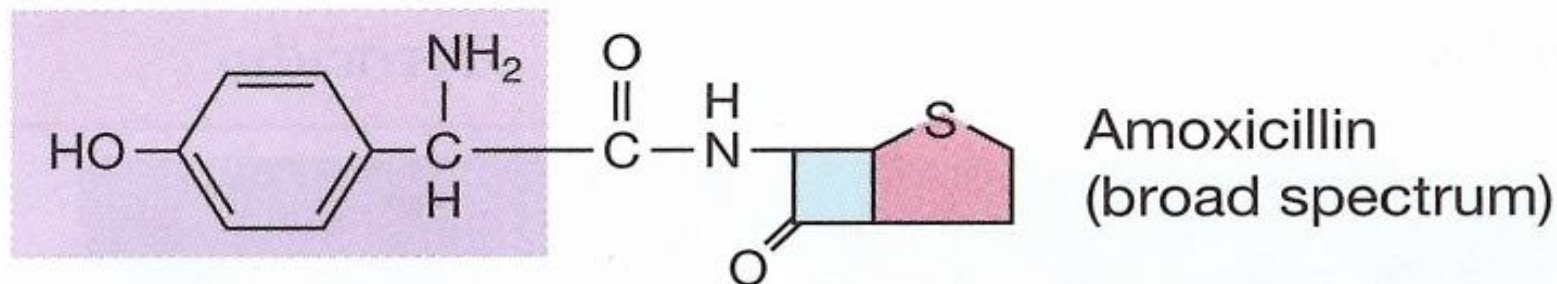
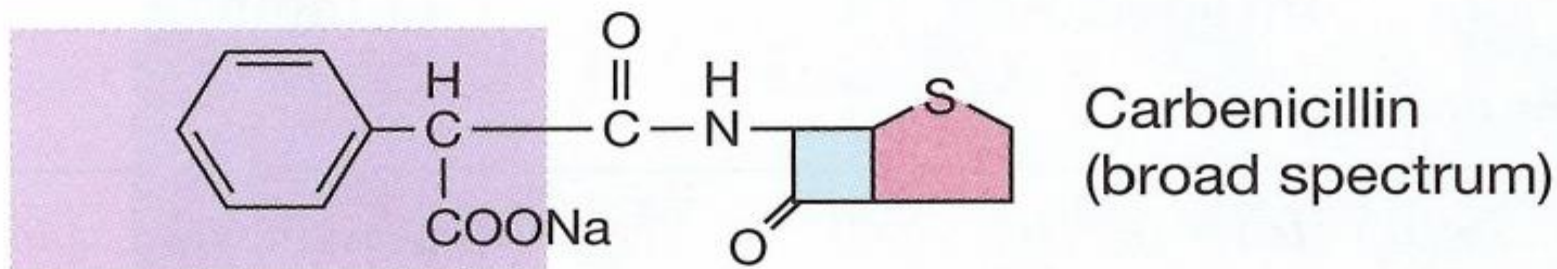
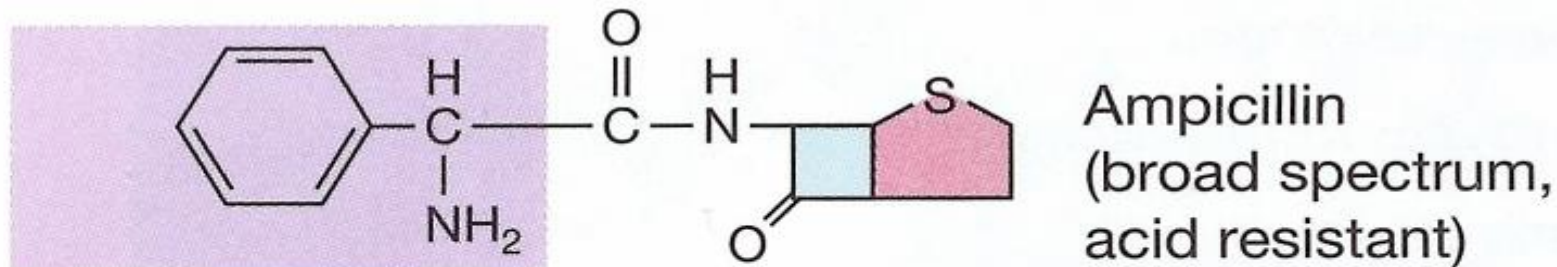
Ez csak a Gram-pozitív kokkusokra hatékony és savra is érzékeny.



Penicillin V
(acid resistant)

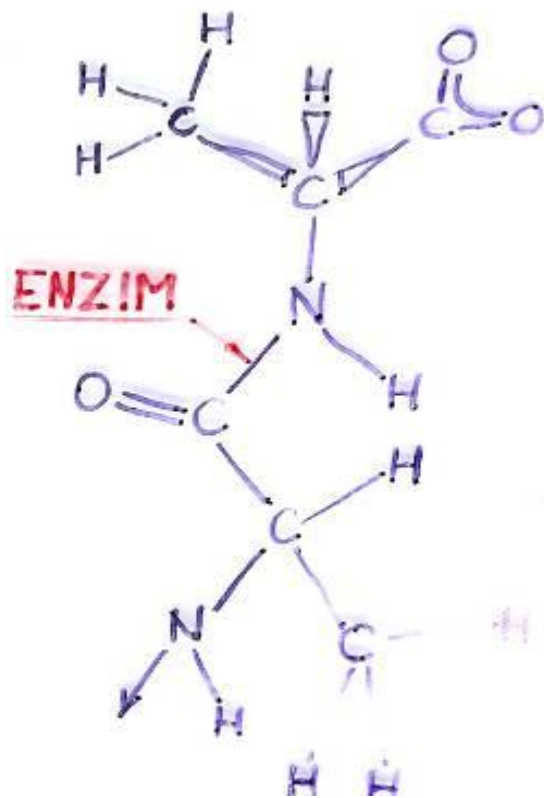


Félszintetikus penicillinek

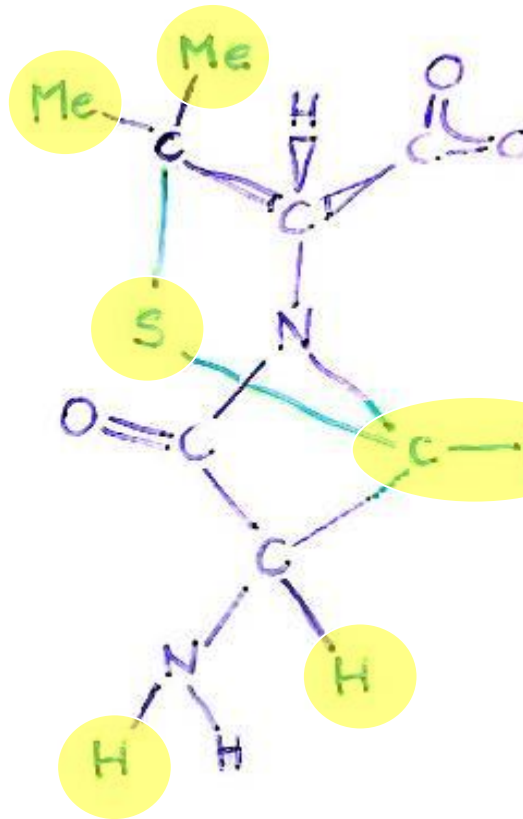


A penicillin hatásmechanizmusa: szerkezetanalógián alapul

D-Ala-D-Ala



penicillin



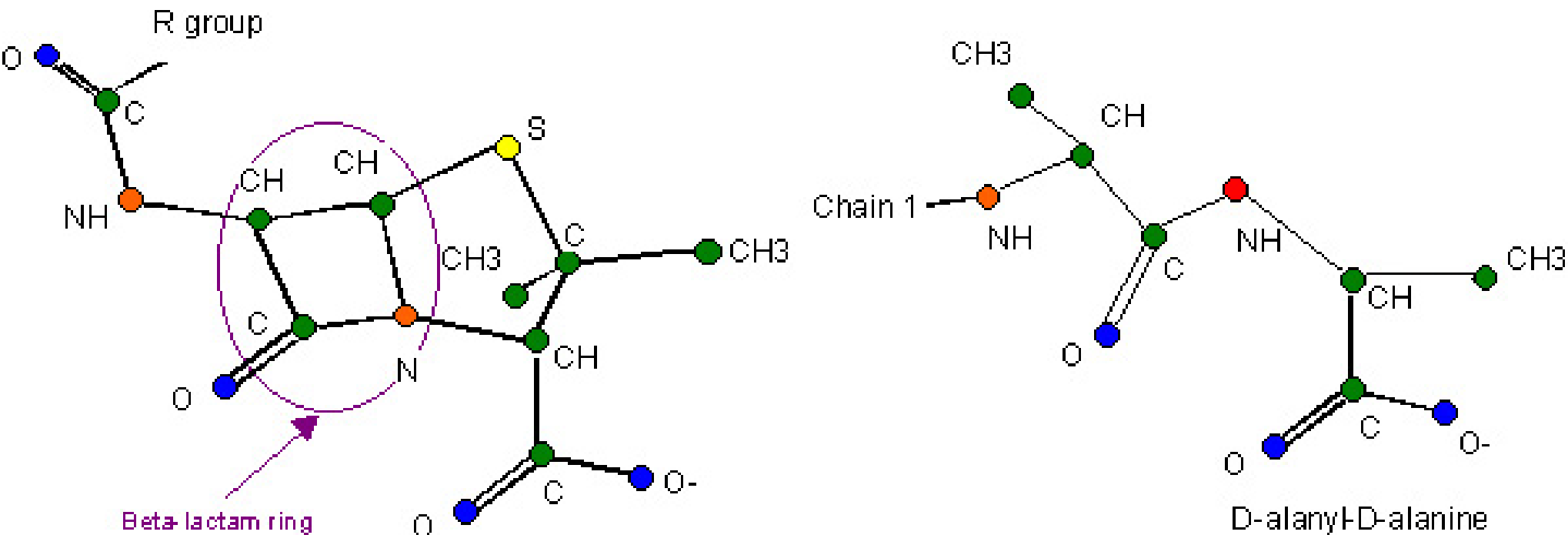
Irreverzibilisen kapcsolódik egy sejtfallépítő enzim kötőhelyéhez

→ 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-alanin+D-alanin peptidlánc véget kellene a sejtfal térhálósításához megkötni (jobbra): Ha ehelyett egy penicillin molekulát köt meg (balra), akkor nem tudja elereszteni többé, és 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).

