

SZÖVETTENYÉSZETEK HATÓANYAG KÉPZÉSÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA

Munkánk során arra törekedtünk, hogy a jó metabolikus aktivitással rendelkező kultúrák létrehozásán túlmenően, megállapítsuk azokat az **optimális tenyésztési körülményeket**, melyek hatására a **biomasszaképzés** és **hatóanyag szintézis** összehangoltan a legkedvezőbb alakul.

Ilyen irányú vizsgálatokhoz

- egyrészt a **génműködést befolyásoljuk** – pl. **hormonális regulációval** – kombinálva a hatóanyagképzés fokozása céljából **prekurzor aminosavakkal** is.
- másrészt a **növényi genom manipulálásával** befolyásoljuk a hatóanyag termelést

Általános biogenetikai rendszer

Elsőként **Vágújfalvi Dezső** (1990)

- Anyagsere fő útjainak egységes vázlatba foglalása
- Az **univerzális anyagsere utakhoz** kapcsolódóan a **speciális anyagsere** fő útjainak kijelölése.

Ennek megfelelően alakíthatók ki a növényi anyagok **főbb csoportjai.**

SZACHARIDOK. Szénhidrát drogok.
Növényi savanyagsere. C-vitamin.

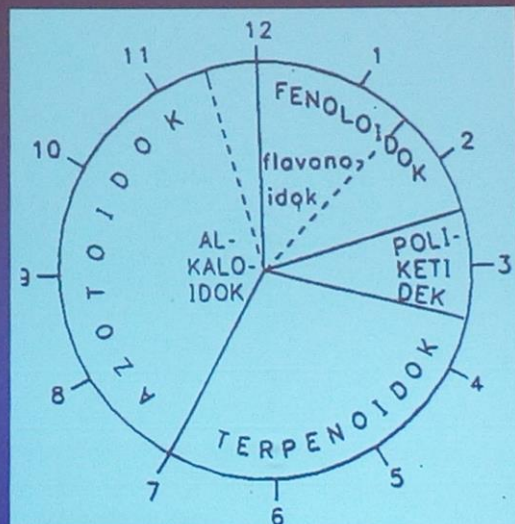
FENOLOIDOK bioszintézise

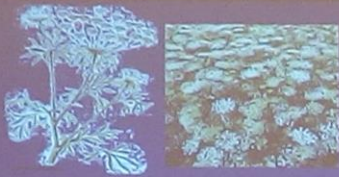
- Egyszerű fenolglükozidok és drogjaik
- Lignánok
- Kumarinok képződése az élővilágban.
- Flavonoidok képződése és biológiai tulajdonságai
- Antocianinok kémiaja, farmakológiája.
- Cserzőanyagok biológiája, kémiaja.
- Naftokinonok
- Antraglikozidokat és származékaikat tartalmazó drogok.
- Orcinol és floroglucin származékok

POLIKETIDEK bioszintézise.

- Zsíros olajok és egyéb lipidek.

**Anyagtörzsekhez tartozó,
ismert szerkezetű vegyületek megoszlása a növényvilágban**
(LUCKNER nyomán)





Ammi majus L. (Apiaceae) *Ammi fructus*

Tartalmaz:

többféle kumarint:

bergaptén 0,04%, imperatorin 0,3%, xantotoxin 0,5%,

Előfordulása: Földközi tenger mentén

Egyiptomban és Oroszo.-ban termesztik



Alkalmazás:

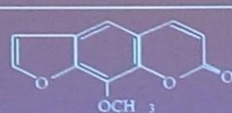
- Vitiligo kezelésére
- Fotodinámiás gyógyszerek céljára:
bergaptén, imperatorin, xantotoxin keveréket
meladinin (Egyiptom), **ammifurin** (Oroszo), **oxsoralen**

Fotoszenzibilizáló hatásmechanizmusuk alapja: a furanokumarinok az epidermisz sejtekben lévő DNS-sel stabil vegyületté (*furokumarin-pirimidin-komplex*) alakul.

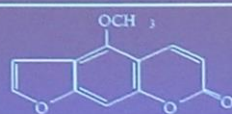
UV fény: 320-390nm.

AMMI MAJUS FURANOKUMARINJAI

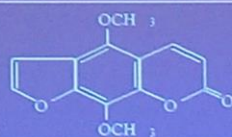
Xantotoxin



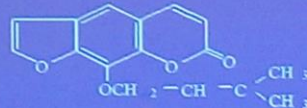
Bergapten



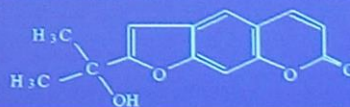
Izopimpinellin



Imperatorin



Marmezin





Ammi visnaga L. (Apiaceae)

Ammi fructus



Tartalmaz:

furano kromonok 2-4 % (**khellint**, visznagin)

pirano kumarint 0,2 - 0,5 % (**visznadin**,

szamidin)

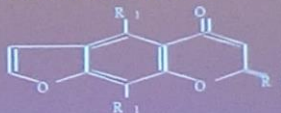
furanokumarinok nyomokban

flavonoidok, illóolaj



AMMI VISNAGA HATÓANYAGAI

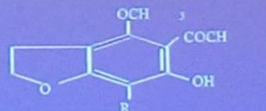
I. Furano- γ -kromonok



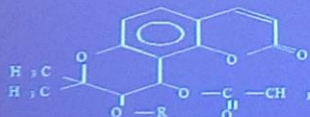
R1:-	R2:-	R3:-	
-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	khellin
-OCH ₃	-H	-CH ₃	visznagin
-OCH ₃	-H	-CH ₂ OH	khellol
-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₂ OH	ammiol
-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₂ O-glukóz	ammiol-glukozid
-OH	-OCH ₃	-CH ₃	khellinol
-OCH ₃	-H	-CH ₂ O-glukóz	khellenin

II. Visznaginon, khellinon

R:-	
-H	visznaginon
-OCH ₃	khellinon



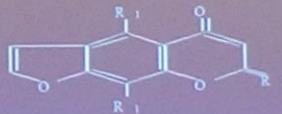
III. Piranokumarinok



R:-		
-CO-CH=C	CH ₃	szamidin
-CO-CH	CH ₃	dihidroszamidin
-CO-CH	CH ₂ -CH ₃	visznadin

AMMI VISNAGA HATÓANYAGAI

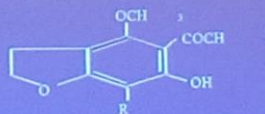
I. Furano- γ -kromonok



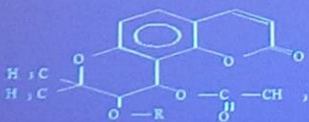
R1:-	R2:-	R3:-	
-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	khellin
-OCH ₃	-H	-CH ₃	visznagin
-OCH ₃	-H	-CH ₂ OH	khellol
-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₂ OH	ammiol
-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₂ O-glukóz	ammiol-glukozid
-OH	-OCH ₃	-CH ₃	khellimol
-OCH ₃	-H	-CH ₂ O-glukóz	khellenn

II. Visznaginon, khellinon

R:-	
-H	visznaginon
-OCH ₃	khellinon



III. Piranokumarinok



R:-		
-CO-CH=C	CH ₃	szamidin
-CO-CH	CH ₃	dihidroszamidin
-CO-CH	CH ₃ , -CH ₃	visznadin

Alkalmazás:

diuretikus

simaizom görcsoldó

asthma bronchiale, gyomor- bélgörcsök

Koronária tágító

Carduben draszté (Madaus) **visznadin**-

szívinfarktus kezelésére

Központi idegrendszerre hat - szedatív hatás

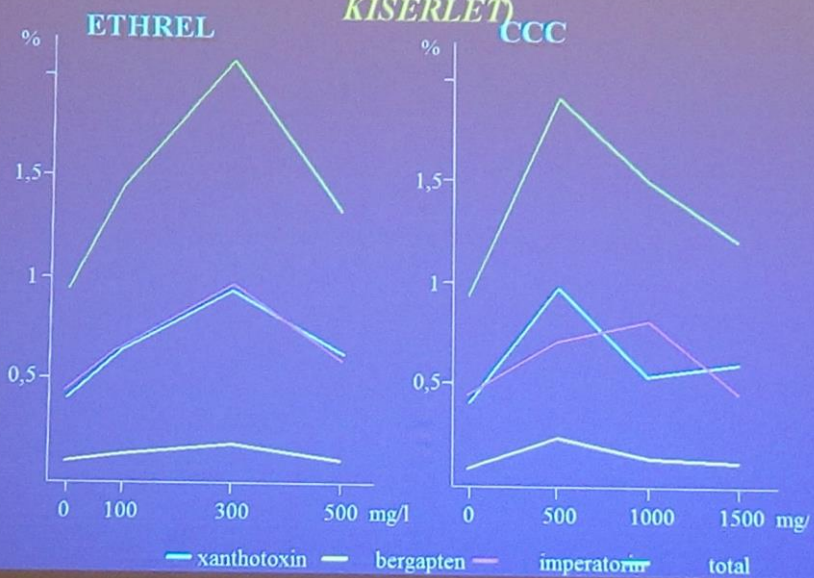
- barbiturátok hatását fokozza

Utóbbi években kimutatták **hipokoleszterinémiás és anti-arterioszklerotikus** hatását. Csökkenti koleszterin plazma szintet (LDL, HDL) és az **apoprotein-B** szekréciót a májban.

PERCENTAGE OF ACTIVE CONSTITUENTS IN THE FRUITS AND LEAFS OF AMMI VISNAGA AND A. MAJUS

Plant	Active constituent	Fruit	Leaf
<i>Ammi visnaga</i>	Khellin	1.468	0.08
	Visnagin	1.002	0.162
	Total	2.470	0.244
<i>Ammi majus</i>	Xanthotoxin	0.408	0.171
	Imperatorin	0.097	0.064
	Bergapten	0.438	0.199
	Total	0.943	0.434

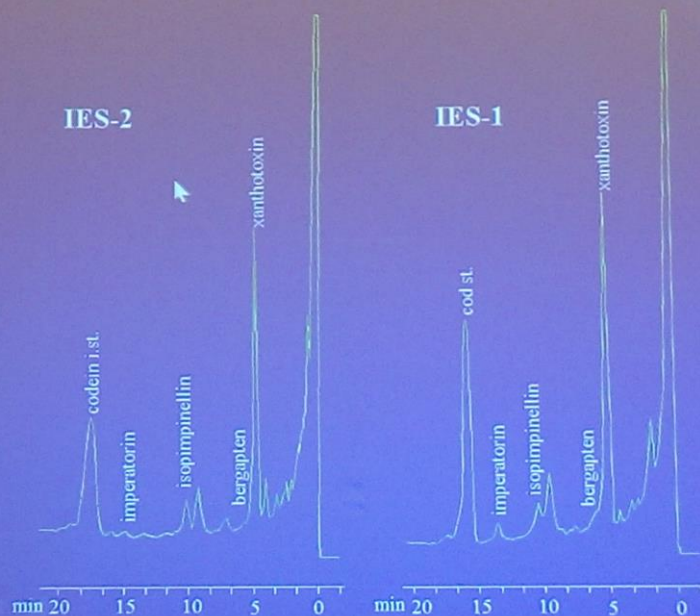
KÜLÖNBÖZŐ KONCENTRÁCIÓBAN ALKALMAZOTT REGULÁTOROK HATÁSA AZ AMMI MAJUS FURANOKUMARIN TARTALMÁRA (TENYÉSZEDÉNYES KISÉRLET)



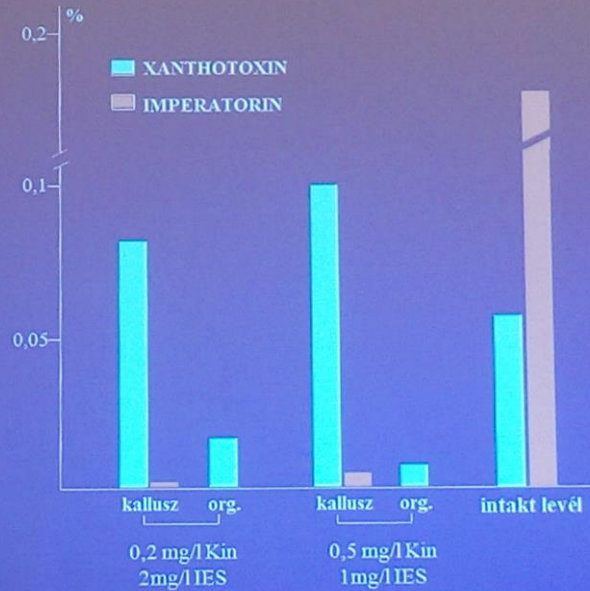
**EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON
FURANOCOMARINE CONTENTS IN TISSUE CULTURES
FROM AMMI MAJUS**

Szövet tenyészet	regulátor mg/l				furanocoumarin %		
	etbre	CCC	Klin	IAA 2,4-DIBA	xanthoxin	bergapten	imperatorin
Kallusz	1				0,010	0,004	-
Kallusz	2				0,028	0,005	-
Kallusz	5				0,036	0,008	-
Org.		1			-	0,005	-
Org.		2			0,052	0,007	+
Org.		3			-	0,011	+
Kallusz			0,2	2	0,082		0,002
Org.			0,2	2	0,017	-	-
Kallusz			0,5	1	0,101	+	0,005
Org.			0,5	1	0,008	+	-
Kallusz			1	1	++	+	+
Org.				1	-	0,021	0,005

**IES TARTALMÚ TÁPTALAJON NEVELT AMMI MAJUS
KALLUSZSZÖVETEK FURANOKUMARINJAI (GC)**



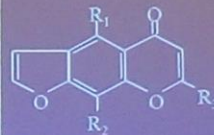
IES ÉS KINETIN HATÁSA AZ AMMI MAJUS KULTÚRÁK FURANOKUMARINTARTALMÁRA



AMMI VISNAGA furano-g-kromon és piranokumarin tartalma

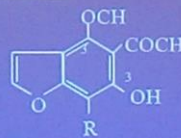
I. Furanokromones

R1-	R2-	R3-	
-OCH	-OCH	-CH ₃	Khellin
-OCH	-H	-CH ₃	visnagin
-OCH	-H	-CHOH	khellol
-OCH	-OCH	-CHOH	ammol
-OCH	-OCH	-CH ₂ OC ₆ H ₁₁ O ₂	ammol glucoside
-OH	-OCH	-CH ₃	khellinol
-OCH	-H	-CH ₂ OC ₆ H ₁₁ O ₂	khellol glucoside

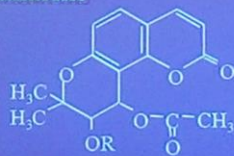


II. Visnaginon, khellinon

R-	
-H	visnaginon
-OCH ₃	khellinon

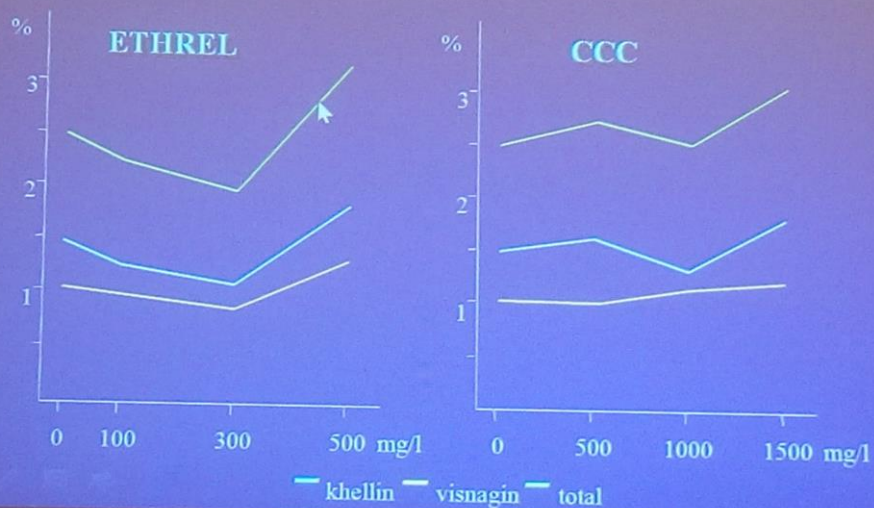


III. Piranocoumarins



R-	
-CO-CH=C(CH ₃) ₂	samidin
-CO-CH(CH ₃) ₂	dihydrosamidin
-CO-CH ₂ -CH ₃	visnadin

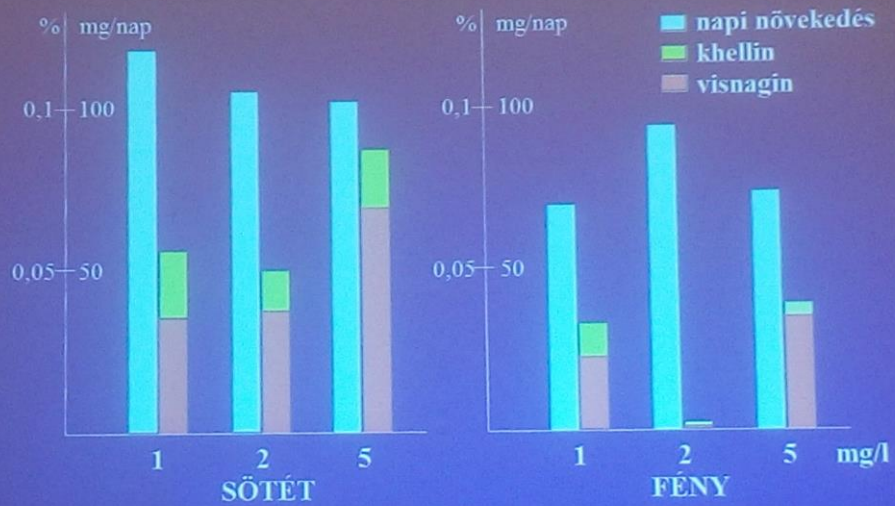
**KÜLÖNBÖZŐ KONCENTRÁCIÓBAN ALKALMAZOTT
REGULÁTOROK HATÁSA AZ AMMI VISNAGA FURANO-
 γ -KROMONTARTALMÁRA (TENYÉSZEDÉNYES
KISÉRLET)**



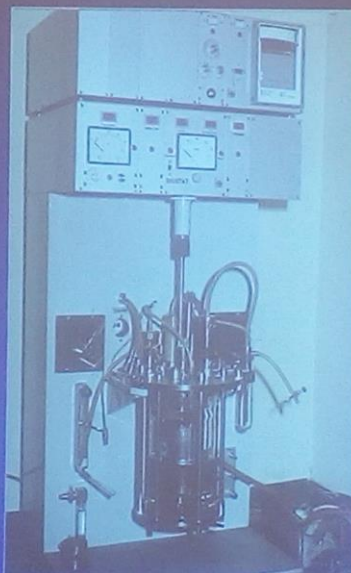
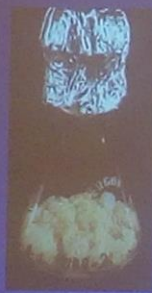
**EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON
FURANOCOMARINE CONTENTS IN TISSUE CULTURES**

Szövet tenyészet	regulátor mg/l					furanocoumarin %		
	ethrel	CCC	2,4-D	kin	NAA IAA	Visnagin	Khellin	Total
Kallusz	1					—	0,014	0,036
Kallusz	2					—	0,015	0,045
Kallusz	5					0,004	0,013	0,031
Org.		1				0,011	0,004	0,037
Org.		2				0,013	0,006	0,053
Org.		5				0,066	0,041	0,118
Kallusz			0,5	1		0,036	0,023	0,062
Kallusz			0,5	2		0,039	0,013	0,059
Kallusz			0,5	5		0,069	0,019	0,089
Kallusz		1,0	1			0,034	0,019	0,059
Kallusz			0,2	2		0,060	0,019	0,092
Kallusz			0,5	1		0,055	0,041	0,120

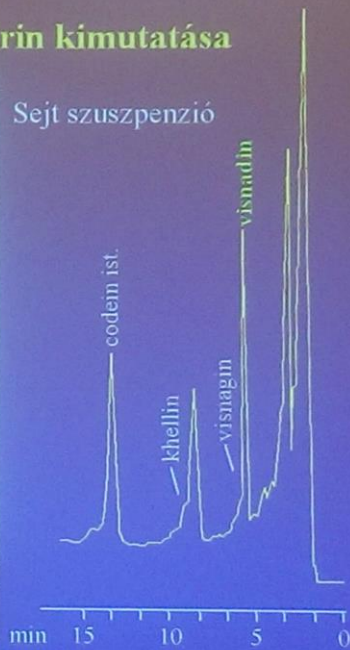
**NES HATÁSA AZ AMMI VISNAGA KALLUSZSZÖVETEK
NÖVEKEDÉSÉRE ÉS FURANO- γ -KROMONTARTALMÁRA**



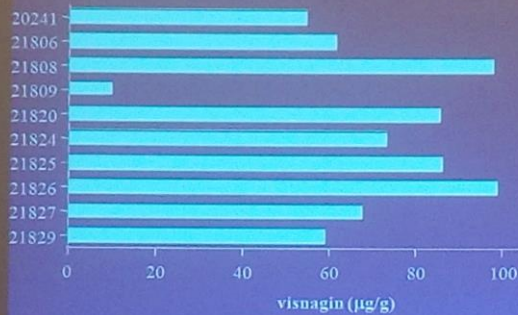
***Ammi visnaga*
furano-g-kromon és piranokumarin kimutatása**



Sejt szuszpenzió



A. *VISNAGA* HAIRY ROOT KLÓNOK (A.r.#A-4) VISNAGIN TALMALMA



SZILÁRD B-5 TÁPTALAJON

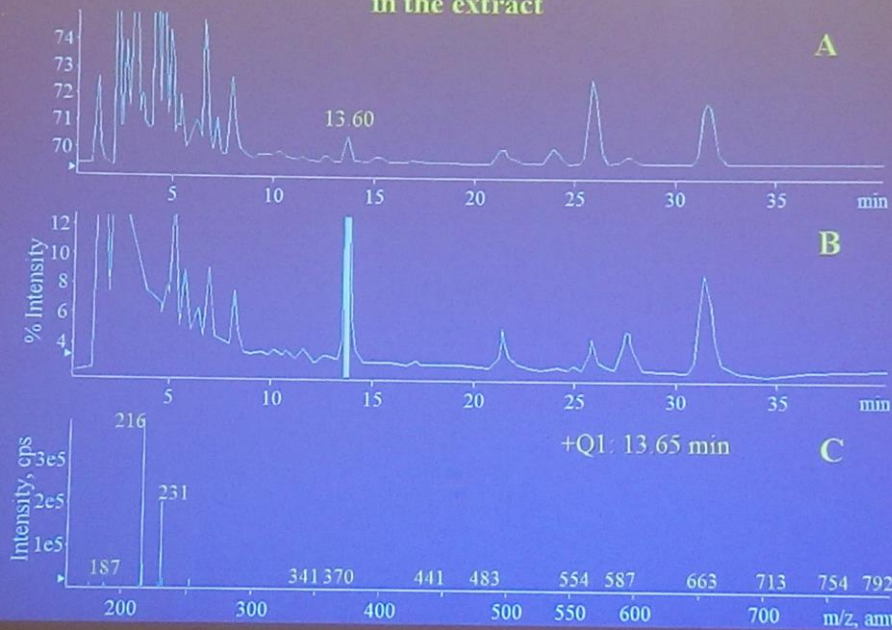


SZILÁRD ÉS FOLYÉKONY

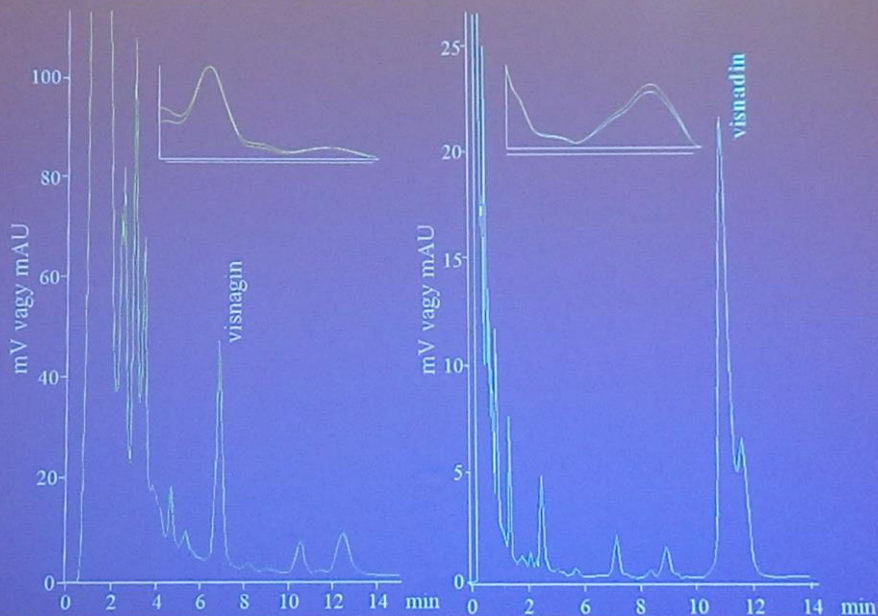
B-5 TÁPTALAJON



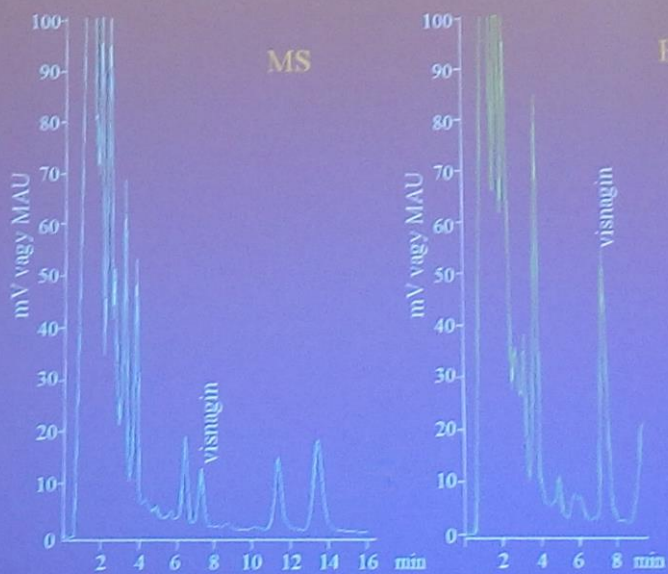
LC-UV (A) and LC-APCI-MS total ion (B) chromatogram of an extract of *A. visnaga* hairy roots and mass spectrum of visnagin (C) identified in the extract



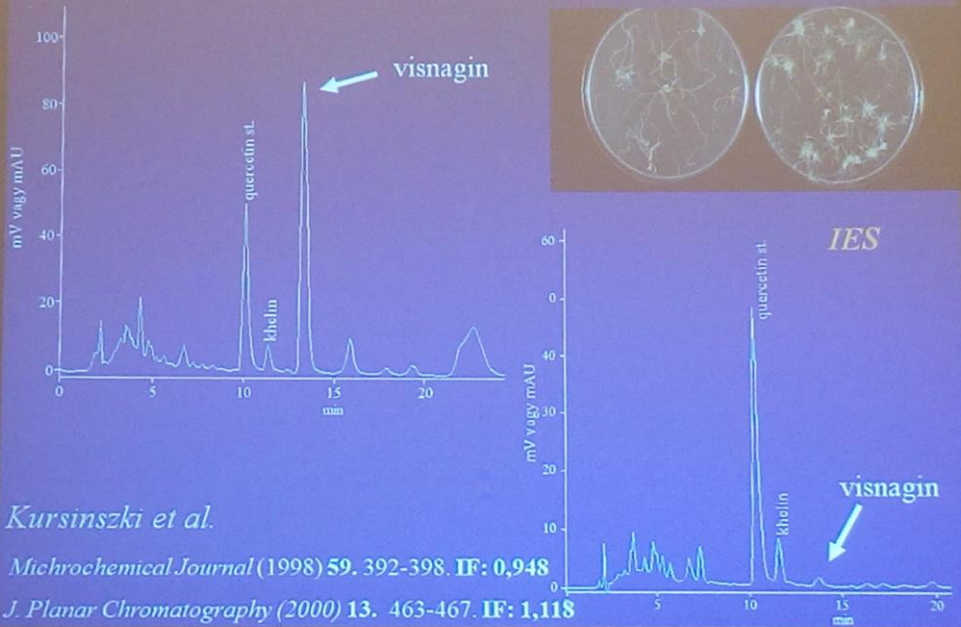
AMMI VISNAGA HAIRY ROOT #20233 KLÓNBAN (A.r. #A,Y)
A VISNAGIN ÉS VISNADIN KIMUTATÁSA HPLC-VEL



MS ÉS B-5 TÁPTALAJON NEVELT AMMI VISNAGA HAIRY ROOT
KLÓN (R-1601-01) FURANO- γ -KROMONJAI (HPLC)



**IES HATÁSA AZ AMMI VISNAGA HAIRY ROOT (A.r.15834)
VISNAGIN TARTALMÁRA**

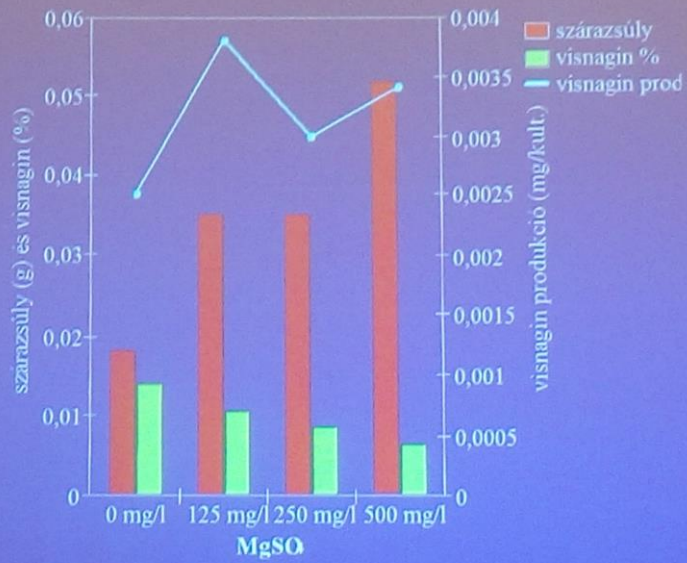


Kursinszki et al.

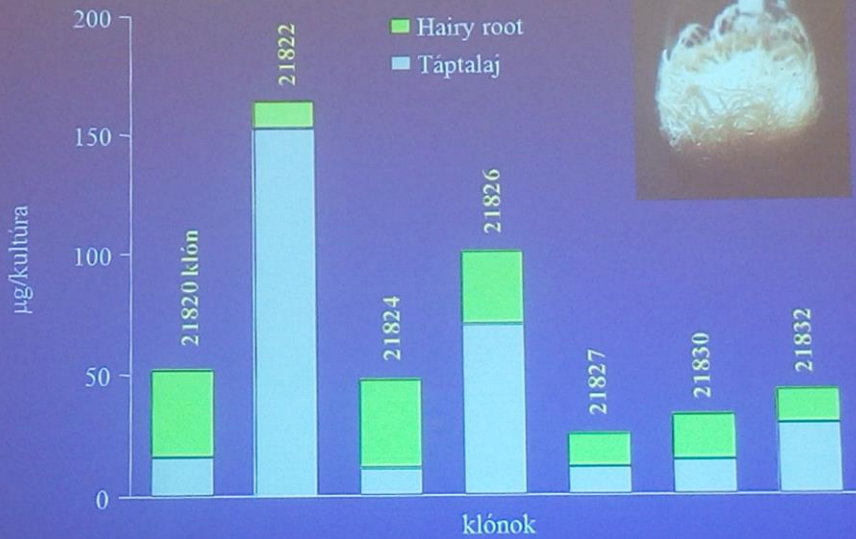
Microchemical Journal (1998) **59**, 392-398. **IF: 0,948**

J. Planar Chromatography (2000) **13**, 463-467. **IF: 1,118**

**MgSO₄ HATÁSA AMMI VISNAGA HAIRY ROOT KULTÚRA
(B-21820 klón) NÖVEKEDÉSÉRE ÉS VISNAGIN PRODUKCIÓJÁRA**



Folyékony B-5 táptalajon nevelt hairy root klónok (A.r: A-4) visnagin produkciója



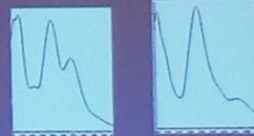
hairy root kultúra (folyékony B-5 táptalaj)



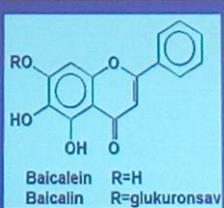
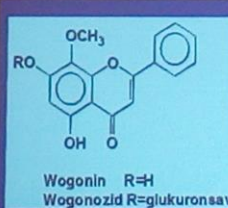
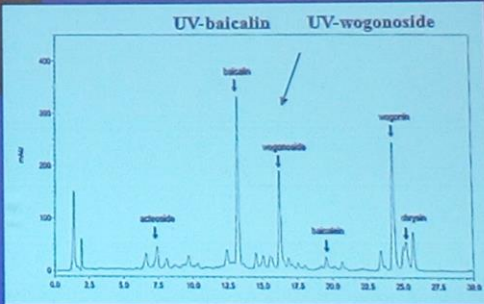
Scutellaria baicalensis

Georgi.

- Újabb megfigyelések szerint flavonoidjai
- a humán immundeficiencia vírust (HIV-1)
 - és a humán T-sejtes leukémia vírust (HTLV-1) gátolják



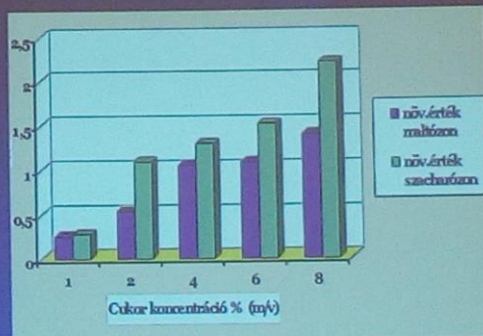
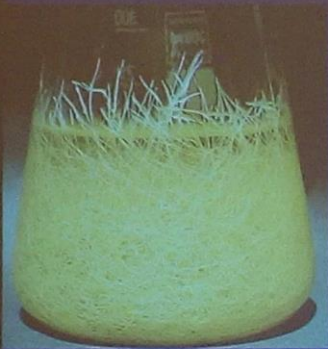
UV-baicalin UV-wogonoside



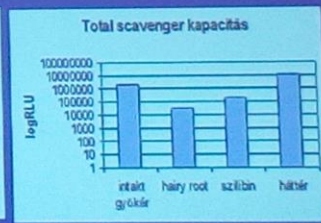
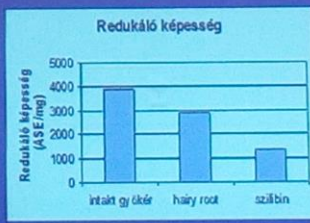
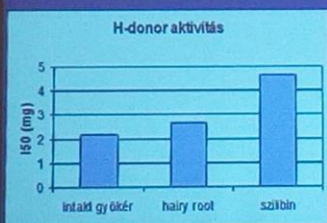
Chromatographia, 2004 1F.: 1,23

Kovács Györgyi

Scutellaria baicalensis Georgi. hairy roots kultúrák flavonoid tartalma



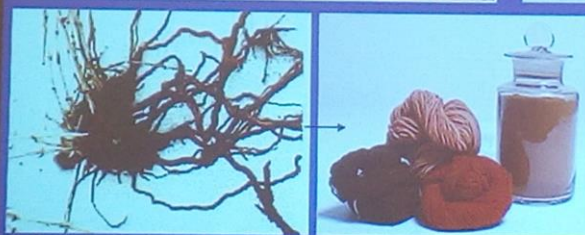
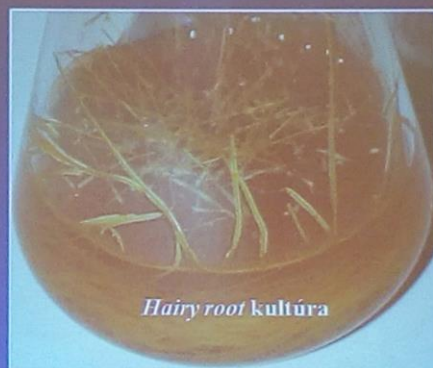
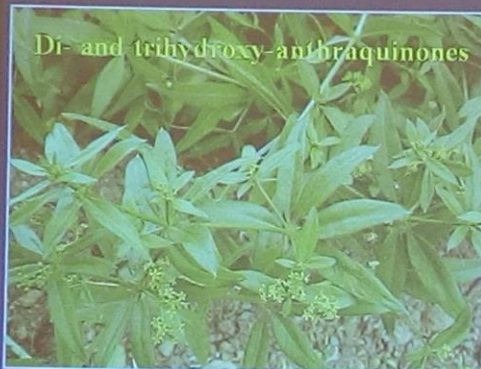
Antioxidáns hatás vizsgálata



Content ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Sucrose (m/v%)	Content ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	<i>baicalin</i>	<i>baicalein</i>	<i>wogonoside</i>	<i>wogonin</i>
1	717	382	1043	424
2	666	521	1263	586
4	488	416	1035	433
6	622	325	1387	295
8	822	387	1920	390

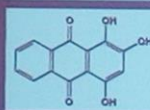
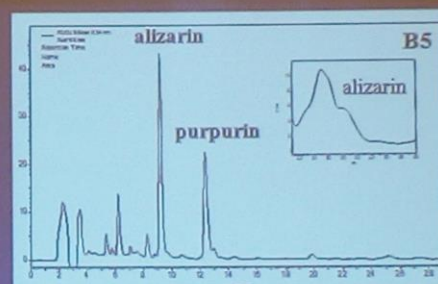
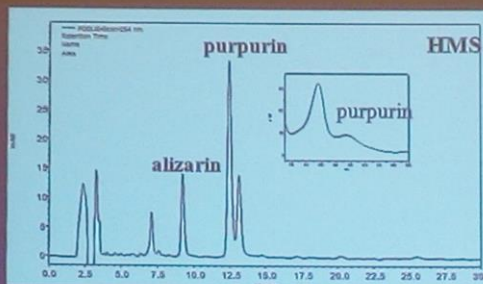
Rubia tinctorum L. (Rubiaceae)



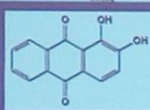
Bányai P.

Hatás/felhasználás:

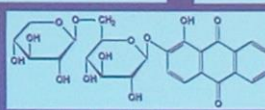
- természetes színezék
- vesekőoldó hatású
- antimutagén (alizarin, purpurin)
- mutagén (lucidin)



purpurin



alizarin

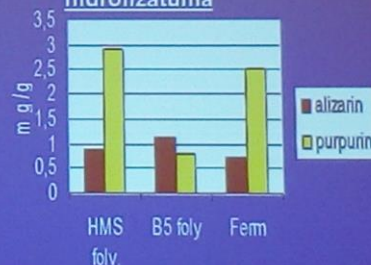


ruberitrinsav

Fő komponensek a **nyers kivonatban**:
ruberitrinsav (alizarin-primverozid),
pszeudopurpurin (purpurin-2-
karbonsav)
lucidin-primverozid

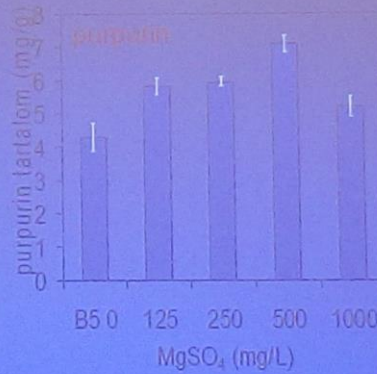
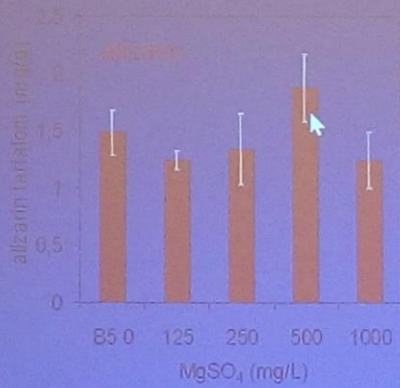
Fő komponensek a **hidrolizátumban**:
purpurin,
alizarin,
lucidin

HMS és B5 folyékony táptalajon tenyésztett *Rubia tinctorum* hairy root kultúra metanolos kivonatának **hidrolizátuma**



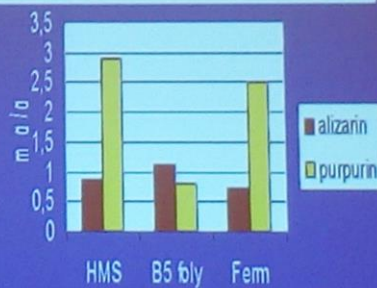
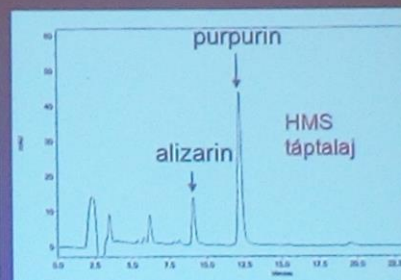
Különböző táptalajon tenyésztett kultúrák

Alizarin és purpurin tartalom változása magnézium hatására *Rubia tinctorum* L. hairy root kultúrákban



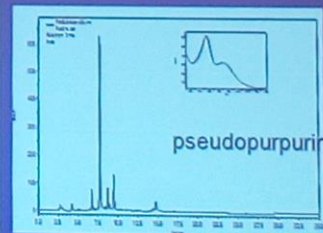
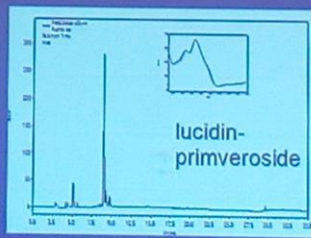
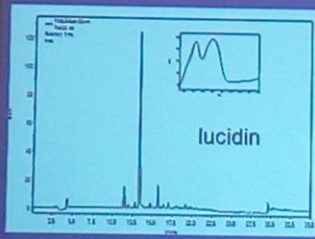
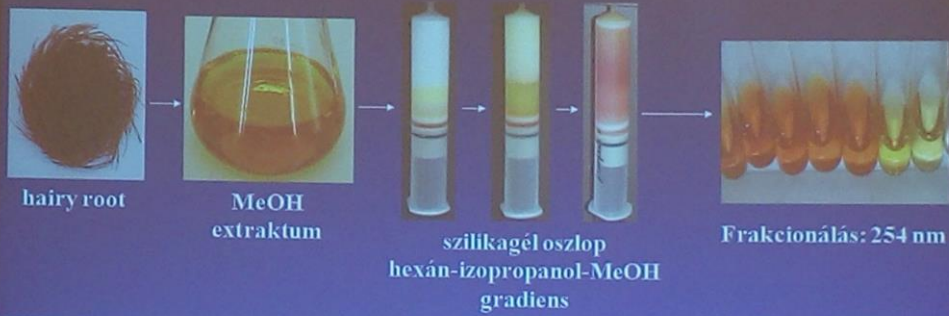
B5 táptalajon a Mg koncentrációjának emelésével jelentősen nőtt az alizarin és purpurin tartalom

Rubia tinctorum L. tenyésztése fermentorban (buborékoszlopos - HMS)

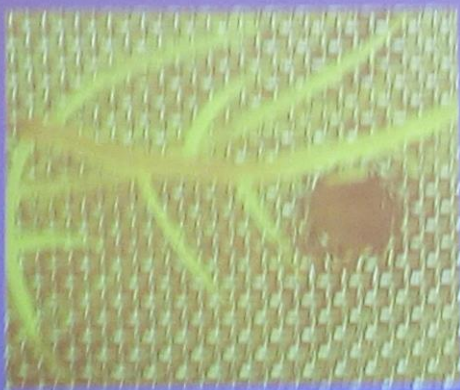


Különböző táptalajon tenyésztett kultúrák

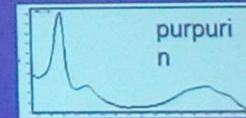
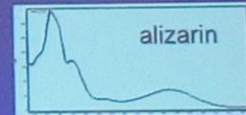
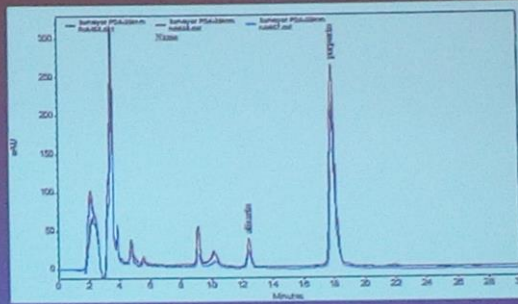
Antrakinonok izolációja flash kromatográfiával



Rubia tinctorum L. =
tenyésztése
fermentorban
B-5 táptalajon

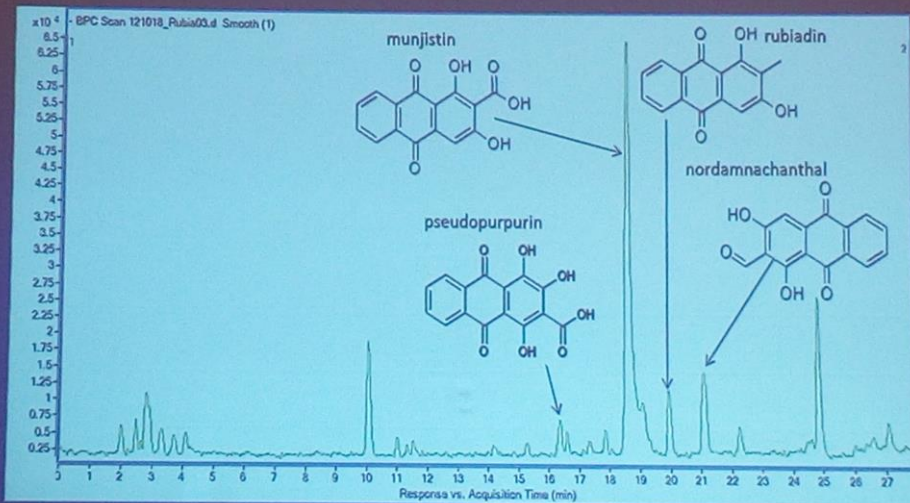


Rubia tinctorum - Metanolos kivonat - savas hidrolizátum



Alizarin: + 25 %
Purpurin: + 130 %

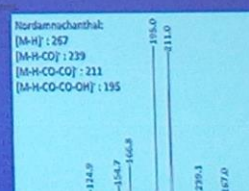
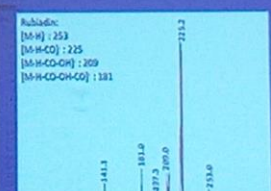
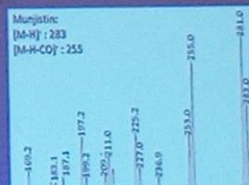
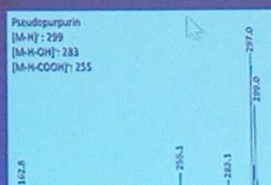
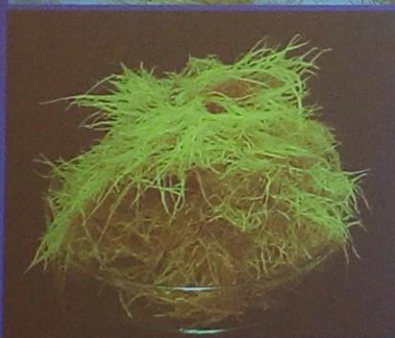
Rubia tinctorum hairy root kultúra vizes (enzimátikus) hidrolizátum totálion kromatogramja (munjisztin, nordamnakantal, pseudopurpurin (purpurin-2-karbonsav) (lucidin mentes!!!))



Rubia tinctorum

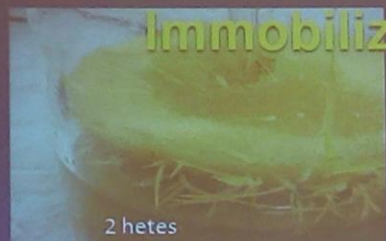
vizes (enzimatis) hidrolizátumban az egyes komponensek tömegspektrumai

pseudopurpurin, munjisztin, rubiadin, nordamnakanal

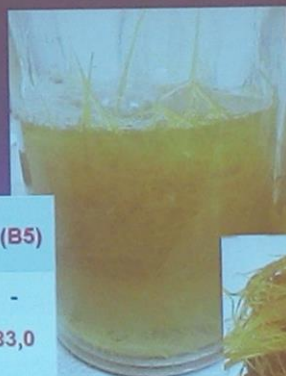


Rubia tinctorum L. tenyésztése fermentorban

Immobilizált Rubia tinctorum kul



2 hetes kultúra



4 hetes



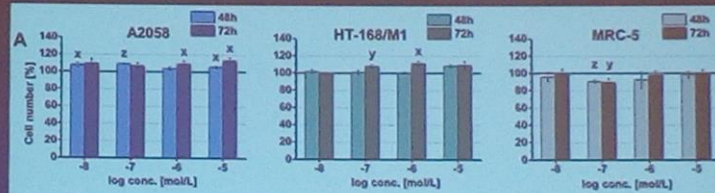
6 hetes kultúra

Hatóanyagok (µg/100ml szűzárta)	1 (HMS)	3 (HMS)	4 (B5)	5 (B5)
Lucidin	1,77	6,50	-	-
Munjisztin	1,69	28,0	-	83,0
Alizarin	-	11,5	-	-
Purpurin	-	7,00	-	-
nem azonosított antrakinon (t _R ≈ 24,81)	-	-	8,00	38,0

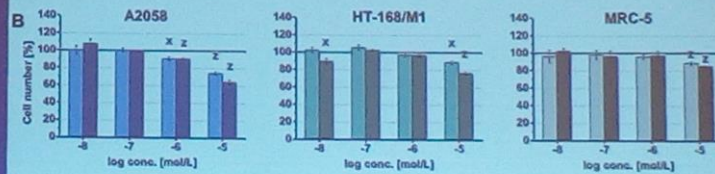
MELANOMAsejtvonalakon

Rubia tinctorum hairy root kultúra vizes (enzimátikus) hidrolizátuma hatékonyabb gátlást fejtett ki, mint az alizarin, vagy purpurin

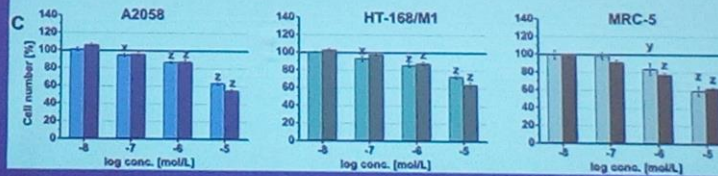
Alizarin



Purpurin



Enzimátikus
hidrolizátum



ÖSSZEFOGLALÁS

Megállapítható, hogy a különböző organizálódási szintű kultúrák hatóanyag képzése jelentősen fokozható:

- a génműködés befolyásolása révén
 - hormonális regulációval
 - prekursor aminosavak segítségével
 - primer anyagcsereutak befolyásolásával
- a növényi genom manipulálásával, géntranszformációval

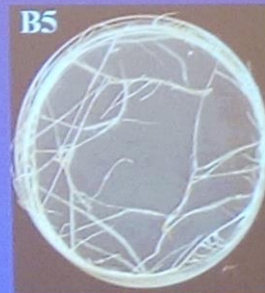
Tagetes patula L. géntranszformált hairy root kultúrák



HAIRY ROOT

Hatóanyagok:

illóolaj
poliacetilének
(tiofén)
flavonoidok
karotinoidok



Szarka Szabolcs

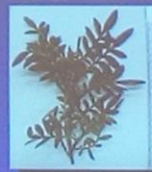
Tagetes patula L.



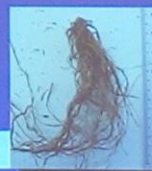
Tagetes patula L. (Asteraceae) torpe bársonyvirág



karotinoidok
flavonoidok
illóolaj



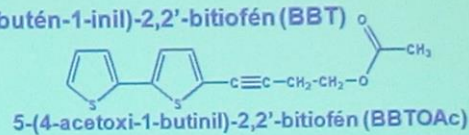
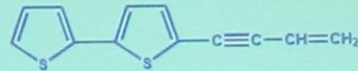
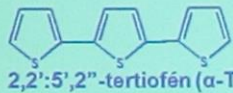
illóolaj



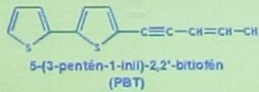
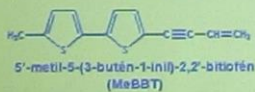
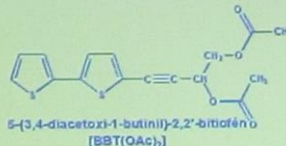
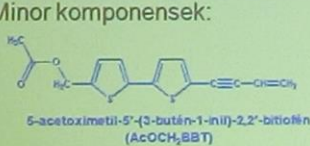
tiofének

Tiofének

Főbb képviselők:



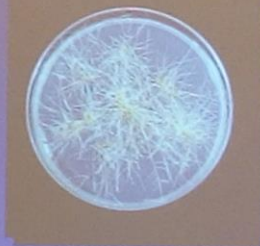
Minor komponensek:



Jellemzők:

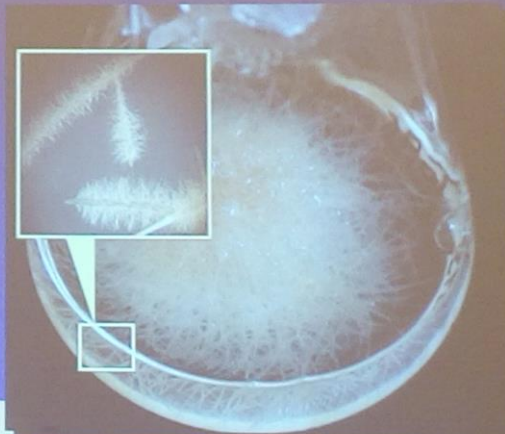
- szintézis gyökérzetben
- fototoxikus biocid hatás:
 - antibakteriális
 - antifungális
 - antivirális
 - citotoxikus
 - nematicid

Hairy root kultúra



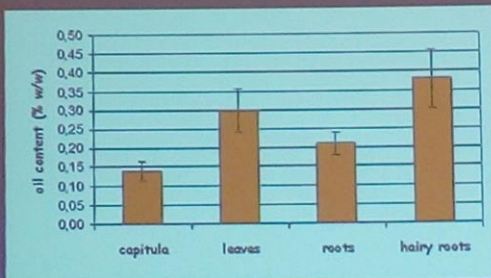
szilárd táptalajon
Tulajdonságok:

- hormonmentes táptalajon intenzív növekedés
- kiemelkedő mértékű speciális metabolit termelés

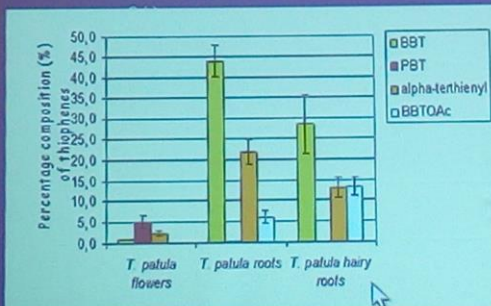
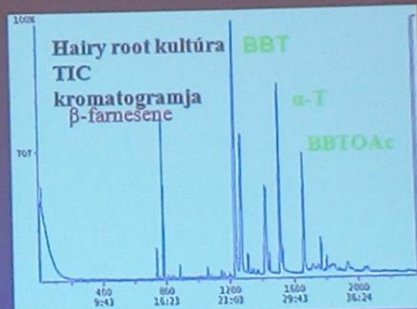


folyékony táptalajon

Illóolaj komponensek és tiofének GC-MS vizsgálata (*Tagetes patula*)



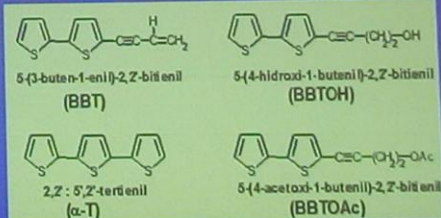
Illó vegyületek (w/w)



Tiofén poliacetilének (%)

Tiofén-vázás poliacetilének

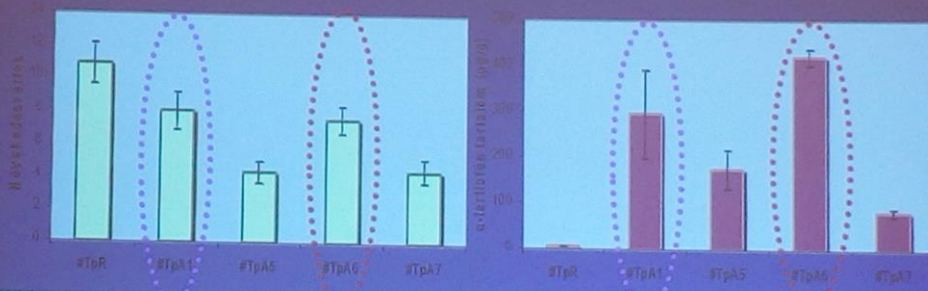
Hatás: biocid (inszekticid, herbicid)



Klónszelekció

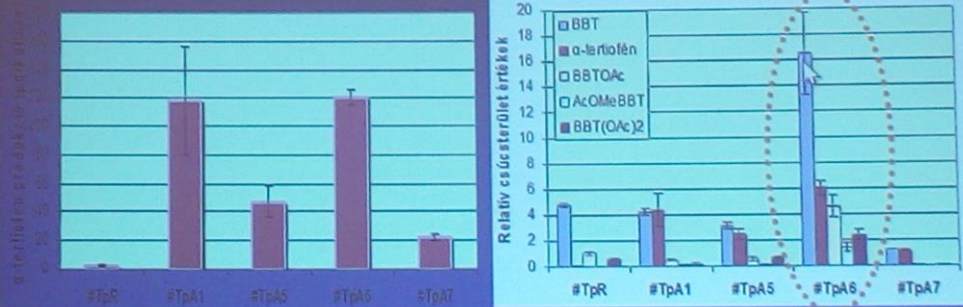
Szelekciós szempontok:

- biomassa produkció
- tiofén termelés



- #TpR jelű klón: kiemelkedő biomassa produkciója ellenére az α-T termelése elhanyagolható
- #TpA1 és #TpA6 klónok: megfelelő növekedési érték, jelentős α-T tartalom

Klónszelekció



- # TpA1 és # TpA6 klónok: azonos mértékű α -T produkció
- a társztiófének mennyisége a # TpA6 klónban a legnagyobb

A tápközeg összetételének

hatása

A $MgSO_4$ hatásának

Biomassza produkció:

- $MgSO_4$ hiányában jelentősen csökkent

Tioféntartalom:

- $MgSO_4$ hiányában jelentősen csökkent

- növekvő $MgSO_4$ conc.:

az α -T és BBTOAc

mennyisége a kontrollhoz

képest szignifikánsan nőtt

a társztiófének a kontrollhoz

képest szignifikánsan nőtt

a társztiófének a kontrollhoz

képest szignifikánsan nőtt

a társztiófének a kontrollhoz

képest szignifikánsan nőtt

a társztiófének a kontrollhoz

képest szignifikánsan nőtt

a társztiófének a kontrollhoz

képest szignifikánsan nőtt

a társztiófének a kontrollhoz

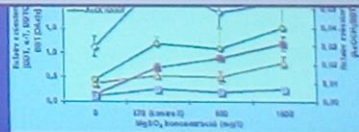
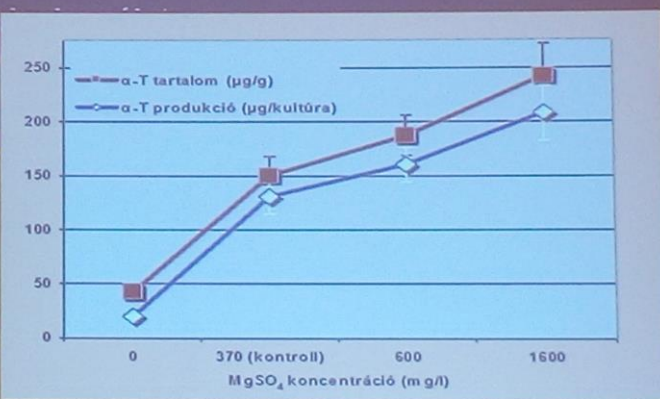
képest szignifikánsan nőtt

a társztiófének a kontrollhoz

képest szignifikánsan nőtt

a társztiófének a kontrollhoz

képest szignifikánsan nőtt



- α -T: 1600 mg/l $MgSO_4$ hatására a kontrollhoz képest 1,6-szeresére, a $MgSO_4$ -mentes tápközeghez képest 5,6-szeresére nőtt

SZÖVETTENYÉSZETEK HATÓANYAG KÉPZÉSÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA

A munka során arra kell törekedni, hogy a jó metabolikus aktivitással rendelkező kultúrák létrehozásán túlmenően, megállapítsuk azokat az **optimális tenyésztési körülményeket**, melyek hatására a **biomasszaképzés és hatóanyag szintézis** összehangoltan a legkedvezőbb alakul.

Ilyen irányú vizsgálatokhoz

- egyrészt a **génműködést befolyásoljuk** – pl. *hormonális regulációval* – kombinálva a hatóanyagképzés fokozása céljából *prekurzor aminosavakkal* is.
- másrészt a **növényi genom manipulálásával befolyásoljuk** a hatóanyag termelést.

Teljesen szekvenált növényi genomok:

pl. lúdfű, rizs, dinnye

- Az első teljes szekvenált növényi genom a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) genomja, aminek szekvenálását 2000. decemberére fejezték be. Az egyik legkisebb növényi genom (pl. a kukorica genomja 45-ször nagyobb).

- A genomszekvenálás megállapítása szerint a dinnye DNS-ében 450 millió bázispár, illetve 27 427 gén van.

(A dinnye genomja jóval nagyobb, mint legközelebbi rokonáé, az uborkáé, amely csak 360 millió bázispárral rendelkezik.)

Megjegyzés: A nukleinsav bázispárok jelentik az élőlények DNS-ének alapegységét.

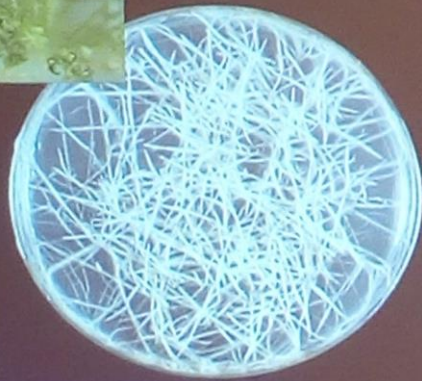
A géntechnológiai módosítás helyszínei

- Sejtmag- (genom) DNS
 - Plasztisz-DNS
 - Mitokondrium-DNS
- } → extrakromoszómális tulajdonságok, anyai öröklésmentet

géntechnológiai szempontból a sejt = a növényvel!



sejtekből *in vitro*, növények regenerálhatók



Hairy root kultúrák

Hormonmentes táptalajon
korlátlanul növekednek
Genetikailag stabilak
Magas hatóanyag-produkció
Új vegyületek bioszintézise



A "tudós kutat, a pénzember halad"- de ketten együtt....

1975

- A rekombináns DNS-technológiákra szóló **moratórium** elfogadása (**Asílo**marban).
Tudósok sürgetik a kormányokat a törvényi szabályozásra.

1976

- A NIH **korlátozza** bizonyos típusú rekombináns DNS-technológiák alkalmazását.

A **New York Times** ellenzi a Nobel-díjat génebézészeti munkákért

(1978: W. Arber et al...)

- H. Boyer és R. Swanson megalapítja a **Genentech, Inc.-t**, az **első biotechnológiai vállalatot**, mely rekomb. DNS-technikával készült élőlényeket gyárt és forgalmaz.

1977

- **Genentech, Inc.**, bejelenti a baktériumban termelt első emberi fehérjét:

a szomatostatinot, az emberi növekedésre ható faktort.

Először használtak klónozott gént fehérjetermeltetésre, ezért sokan ezt tartják a Biotechnológia Korszak (*Age of Biotechnology*) kezdetének

A növénybiotechnológiai

megközelítés a növényi sejtek **totipotenciájának** kihasználásán alapul.

1. **Kezdetek:** 1900-1950: a szövettenyésztés alapjainak megteremtése

1902-04: **Haberlandt-Hennig:** első sejtenyészetek

1910-20: steril tenyésztés módszertanának kidolgozása

(1925: **Laibach:** hibrid embrók nevelése táptalajon)

1930-40: szövettenyésztési iskolák dohánnyal, sárgarépával (kalluszok nevelése): **White** (USA), **Gautheret** (Franciaország)

2. A növényi sejtek totipotenciáján alapuló **szomatikus sejtgenetika** kialakulása (1950-80)

3. A növényi géntechnológia kialakulásának **időszaka** (1980-)

A **restrikciós enzimek** felfedezésével indult "világhódító" útjára a **70-es évek** **génteknológia / génebézészet / génmérnökösökódés / génmanipuláció....**

A GÉNTÉCHNOLÓGIA FEJLŐDÉSÉNEK FONTOSABB ÁLLOMÁSAI I.

- 1973 Első génátültetés **mikrobákban**
- 1975 Génebérszet biztonsági irányelvei
- 1976 Első „kereskedelmi” jellegű géntechnológiára szakosodó vállalat
- 1977 Első génátültetés **emlős-DNS felhasználásával**
- 1978 Emberi inzulin kísérleti termelése baktériumba juttatott emberi gén felhasználásával**
- 1980 Első olyan **gyár felépítése, amelyben mikroba**ba beépített génekre alapozva kívánnak **hormont, oltóanyagokat és enzimeket** gyártani.

Lehet, hogy az édesburgonya, ez a szerény élelmiszernövény a fejete tetejére állítja a GMO élelmiszerekről szóló vitát ???

2015. május 1. (Ghenti Egyetem)

Az ÉDESBURGONYA genomjába természetes úton Agrobacterium gének kerültek - vagyis egy olyan talajbaktériumból, melynek segítségével a kutatók számára lehetségessé vált a növények genetikai módosítása.



A tudósok frissen megjelent közleménye (a *Crop Biotech Update* itt közöl róla összefoglalót): <http://www.pnas.org/content/112/18/5844>

Ezek az „idegen” DNS-darabok mind a 291 megvizsgált édesburgonya-fajtában megtalálhatók, ami „arra utal, hogy az *Agrobacterium*-fertőzés az evolúció során történetesen” - vélik a tudósok.

A Ghenti Egyetem és a límai Nemzetközi Burgonyaközpont tudósai meglepő felfedezést tettek. Kiderült, hogy a világ bármelyik tájáról származó édesburgonya az *Agrobacterium* eredetű géneket hordoz - abból a talajbaktériumból, amelyből génátvivő képességének köszönhetően a legkedveltebb genetikai módosító rendszert fejlesztették ki, új gének növényekbe való beültetésére.

A „géntechnológia” nem új keletű

Mary-Dell Chilton:

Hosszú időn keresztül, talán az évek millióin át, látta el a közönséges talajbaktérium, az *Agrobacterium tumefaciens* azt a feladatot, amivel a kutatók ma még csak kísérleteznek.

Ez a baktérium egyik növényfajból a másikba vitt át örökítőanyagot, és a fogadó növény örökítőanyagába beépítette azokat.

Scientific American, 1983. június

GÉNTECHNOLÓGIA FEJLŐDÉSÉNEK FONTOSABB ÁLLOMÁSAI II.

- 1981 Egységes, úgynevezett monoklonális ellenanyagok megjelenése a piacon az USA-ban. Biotechnológiai ipar kibontakozása. Génátültetés, génszűrés „rutin” feladat.
- 1982 Első géntechnológiával előállított oltóanyag humán inzulin forgalomba kerülése az USA-ban
- 1983 Első izolált gén átültetése az egyik növényfajból a másikba
- 1984 Legnagyobb ismert gén sorrendjét sikerült meghatározniuk, sikerült klónozniuk is a megfelelő gént. A „faktor 8”, a vérfehérje véralvadásban részt vevő gén, nem kevesebb, mint 186 ezer bázisból áll.
- 1997 Első emlős klónozása

Genetikailag módosított szervezetek

- **Néhány terápiás vegyület, melyet rekombináns technológiával állítanak elő**

Hormonok: follikulus stimuláló hormon, inzulin, szomatotropin

Vakcinák: Cytomegalovírus, Hepatitis B

Immun szabályozók: Tumor nekrosis faktor

Véralvadás szabályozók: VII, VIII, IX faktor

A géntechnológiai ipar gyógyszerkészítményei

Termék megnevezése	Gyártó megnevezése
Humán inzulin alfa-Interferon béta-Interferon humán növekedési hormon	Eli Lilly/Genentech Shering-Plough/Biogen Serona/Toroy (Japán) Genentech/KabiGen (Svédország)
alfa-Interferon hepatitis-B oltóanyag (májgyulladás)	Exovir Merck/Chiron
alfa-Interferon béta-Interferon gamma-Interferon hepatitis-B oltóanyag immuntoxin interleukin-2 proinzulin retrovírus oltóanyag	Enzo Biochem Shell Oil (több gyártó) Smith Kline Beckman Xoma (több gyártó) Eli Lilly Smith Kline Beckmann
12 készítmény előklinikai vizsgálat (állatkísérlet) kifejlesztve fejlesztés alatt kutatási szakaszban gyártási szerződés Egyéb	27 gyártó 29 gyártó 27 gyártó 31 gyártó 8 gyártó 19 gyártó

Genetikailag módosított szervezetek

- **Pharming for Farmaceuticals**
 - olyan transzgénikus élőlények létrehozását és kultivációját jelenti, melyekben a humán gyógyászat számára fontos anyagokat termelnek
 - állatoknál törekednek a szövetspecifitásra
 - tejbe kiválasztható legyen
 - növények is alkalmasak, de szigorú előírások vannak a termesztésnél

Régi és új biotechnológia fogalma, összehasonlításuk

régi: *fermentáció és klasszikus nemesítés*

új: *genetikai módosítás,*

pl. növény- és állatbiotechnológia



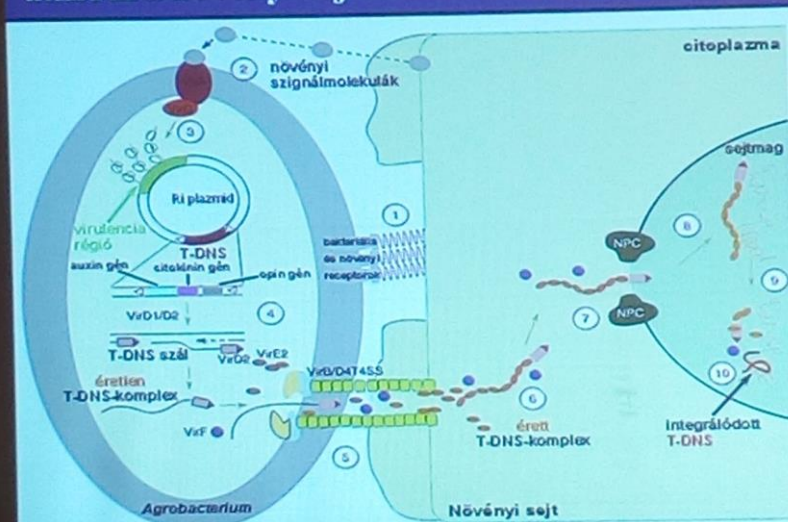
GÉNTRANSZFORMÁCIÓ

Új perspektívát jelent a növényi genom manipulálásával – természetes géntranszformációval létrehozott – u.n. „*hairy root*” kultúrákban termeltetni a hatóanyagokat.

Géntranszformáció

Agrobacterium plazmidok, mint természetes génátviteli rendszerek

A Ri-plazmid egy része, az ún. T-DNS a baktériumfertőzés során átkerül a növényi sejtekbe és stabilan integrálódik a sejtmag DNS-ébe.

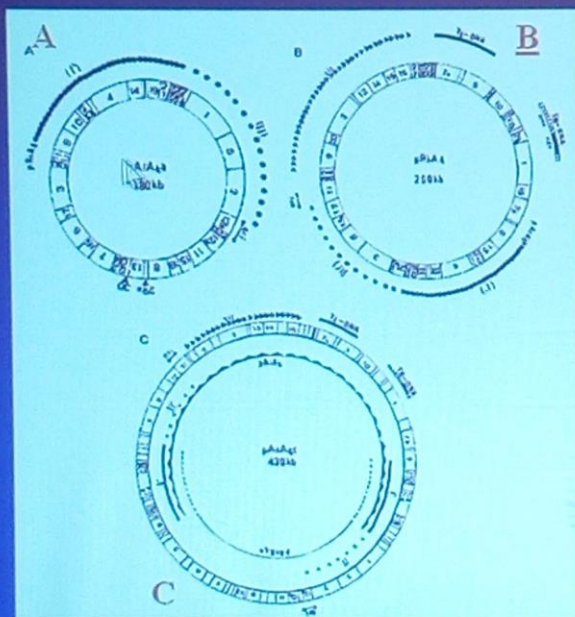


Agrobacterium rhizogenes

- Gram-negatív növény patogén talajbaktérium
- T-DNS stabilan integrálódik a növényi genomba
- *hairy root* indukció

Agrobacterium mediált géntranszformáció modellje (Tzfira és Citovsky 2006 nyomán)

Agrobacterium rhizogenes plazmidok restriktációs térképe



A. plazmid (180 kb):

nem vesz részt közvetlenül a transzformációban, csak segíti

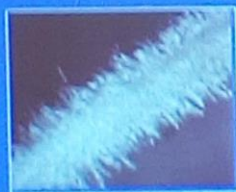
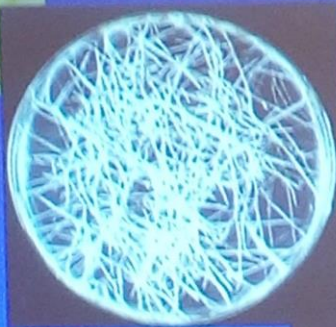
B. plazmid (250 kb):

Ri plazmid gyökeresedést idéz elő

- TL-DNS szakasz segíti a hairy root kialakulást (hormon termelést, fenoloid képződést aktiválja)
- TR-DNS szakasz kerül át a növényi genomba

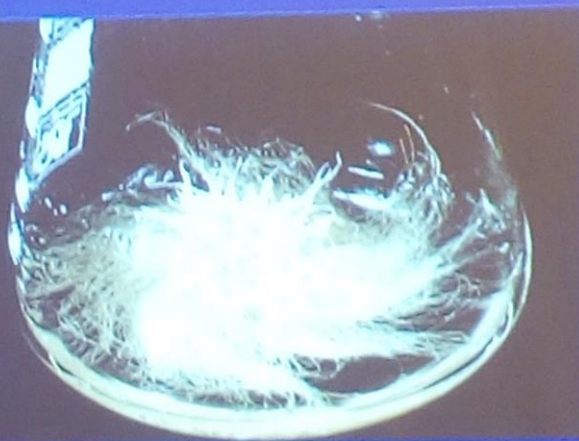
C. plazmid (250+180=430 kb):

A két plazmid összeolvadásából keletkezett integrált plazmid.



Hairy root kultúrák

szilárd és folyékony MS-2 táptalajon



Plant Growth Regulation (2000) 30, 105-110. IF: 0,837

A növényi sejtek és protoplasztok esetén alkalmazott vektor nélküli eljárások

elektroporáció

(a sejtmembránban elektromos erőtér hatására keletkező pórusokon keresztül jut be az idegen DNS),

elektrofúzió

(elektromos erőtér segíti elő a protoplasztok fúzióját)

génbevitel polietilén-glikol (PEG) közvetítésével

(a PEG elősegíti a protoplasztok fúzióját),

génbevitel liposzómákkal

(a mesterségesen létrehozott liposzómák képesek fuzionálni a protoplasztokkal),

ultrahanggal történő génbevitel,

mikroinjektálás

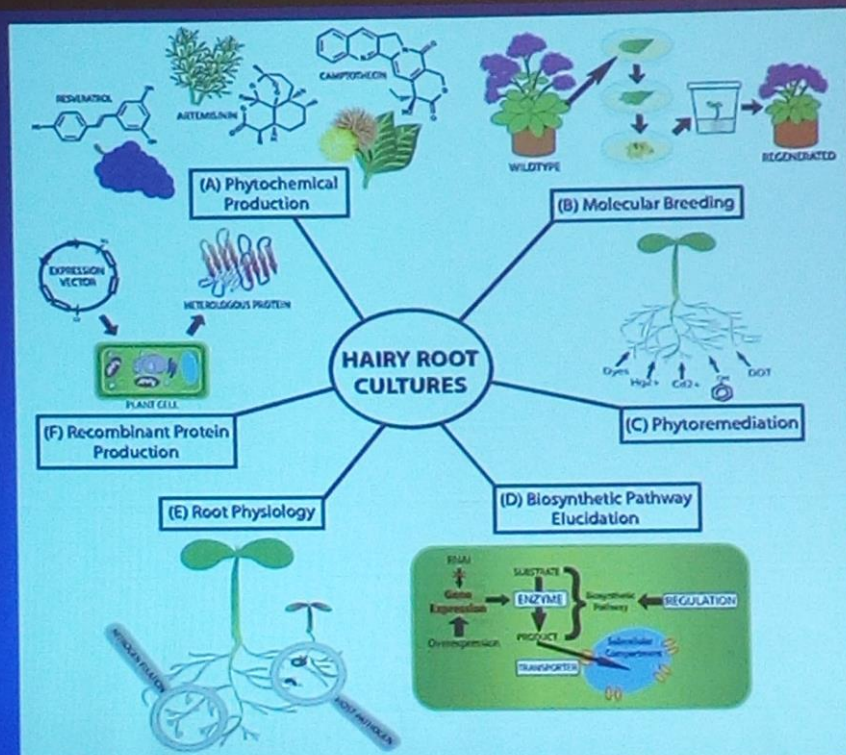
(mechanikai módszer, idegen DNS sejtbe, vagy sejtmagba való közvetlen bejuttatása mikromanipulátor segítségével, mikroszkóp alatt).

DNS bejuttatása génelővessel

(nagy sebességre felgyorsított, felszínükön DNS-t tartalmazó nemesfém szemcséket alkalmaznak),

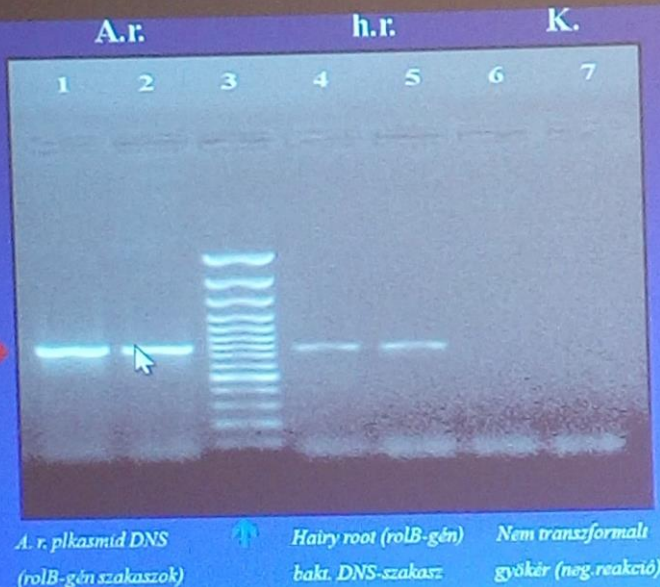
szilikon-karbíd tűk alkalmazása

(a sejteket DNS tartalmú folyékony tápközegben szilikon-karbid tűkkel együtt rázatják).



GÉNTRANSZFORMÁCIÓ ELLENŐRZÉSE

- **Opin kimutatás** (papír elektroforézis, HPLC)
 - az idegen gén működését ill. annak produktumát lehet kimutatni.
- **PCR technika** (gél-elektroforézis)
 - az idegen gén jelenlétének kimutatása a növényi genomban
- **Blot analízis** (gél-elektroforézis)
 - az idegen gén beépülési gyakoriságát is vizsgálni lehet



A PCR minta összetétele:

- 2,0 μ l DNS
- 3,3 μ l steril desztillált víz
- 1,0 μ l puffer
- 1,0 μ l 25mM MgCl₂-oldat
- 1,0-1,0 μ l génspecifikus primer
- 0,5 μ l DNS polimeráz
- 0,2 μ l 100mM dNTP

A PCR részfolyamatai:

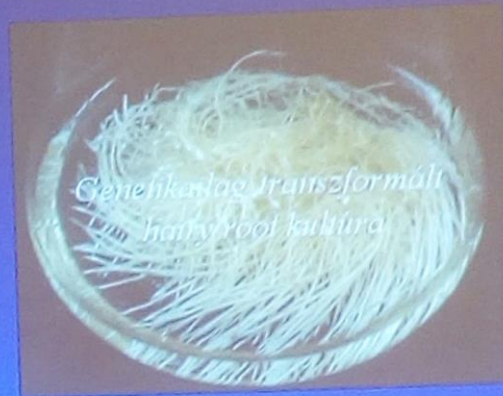
- denaturáció: 94°C 1 percig
- primer-kötődés: 55°C 1 percig
- polimerizáció: 72°C 3 percig

A hairy root kultúrákban sikerült kimutatni a bakteriális DNS jelenlétét

GÉNTRANSZFORMÁCIÓ

A növényi sejtek esetén alkalmazott vektor nélküli eljárások

- elektroporáció
- elektrofúzió
- génbevitel polietilén-glikol (PEG) közvetítésével
- génbevitel liposzómákkal
- ultrahanggal történő génbevitel
- mikroinjektálás
- DNS bejuttatása génbelövással
- szilikon-karbid tűk alkalmazása



Hairy root kultúrák

- Hormonmentes táptalajon korlátlanul növekednek
- Genetikailag stabilak
- Magas hatóanyag-produkció
- Új vegyületek bioszintézise

GMO növények gyógyászati felhasználása a következő évtizedekben

A gyógynövények mellett egyre nagyobb szerepe lesz a gyógyításban egyéb genetikailag módosított növényeknek is az következő évtizedekben.

A gyógyszeralapanyagok, gyógyszermolekulák egy csoportjának előállítására baktérium-, gomba- és állati sejtenyészetek helyett teljes növény felhasználásával is történhet.

A növényi sejtek, mint kis bioreaktorok szintetizálják a speciális molekulát, melyet tisztítás után vagy tisztítás nélkül hasznosítanak.

A szintézishez szükséges program géntechnológiai módszerrel beültethető a sejtmagba, vagy a növényi sejtben nagy számban lévő kloroplasztiszok genetikai állományába.

A kloroplasztisz-transzformált GM növények általában nagyobb mennyiségben termelik a sejt számára idegen anyagot.

GENOMSZERKESZTÉS

Korszakalkotó jelentőségű Doudna és Charpentier professzorok csapata által (University of California Berkeley) 2012-ben publikált és szabadalmaztatott eljárás, a CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) génszerkesztésre való alkalmazásáról.

A módszer kidolgozója „molekuláris szike” hasonlattal illette az eljárást: „A tudósok ezzel a módszerrel nagyon pontosan tudják módosítani az élőlények DNS-ét és sejtjeit – az egész genomból, amely például az ember esetében hárommilliárd bázispárból áll, a DNS kód egyetlen betűje megváltoztatható.”

Ezzel az eszközzel a DNS szerkeszthetővé válik, nem kívánt darabkákat lehet vele kivágni vagy akár kicserélni más szegmensekkel. A *Science* folyóirat már 2013-ban az év legfontosabb tudományos felfedezései közé választotta ezt a módszert.

A felfedezés jelentőségét jól tükrözik a Solvo Biotechnológiai Zrt. vezérigazgatójának szavai is: „A rendszer segítségével nagyon precízen lehet géneket szerkeszteni. A rendszer lényegében egy programozható molekuláris olló, amelynek segítségével tetszőleges szakaszokat lehet kivágni a DNS-ből, és azok helyére más DNS-szakaszokat lehet beilleszteni. A CRISPR-Cas9 technológia annyira leegyszerűsítette, illetve csökkentette a genetikai módosítás költségét, hogy akár egy házi laborban is készülhet átszabott DNS-minta.”

A CRISPR-Cas9 nevű génszerkesztő néhány év alatt felforgatta a genetikát, mert minden korábbinál pontosabb és rugalmasabb célzott DNS-szerkesztést tett lehetővé.

A módszer két összetevőből áll: a CRISPR az információt szállító és a célt belövő RNS, míg a Cas9 az az enzim, amely a DNS darabolását végzi. A kutatók rájöttek arra, hogy miként vehetik rá a Cas9-et, hogy molekuláris méretű „ollóival” bármilyen DNS bármelyik szakaszát ki tudja vágni. A végeredmény egy egyszerűen programozható biotechnológiai eszköz. A CRISPR-Cas9 egyszerre több gént is célba vehet, ami nagy előny az olyan összetettebb betegségek esetében, amelyeket nem egy, hanem több gén okoz. A módszer új változata, a CRISPR-CasX még ennél is ígéretesebb, mert kisebb és ezért könnyebb eljuttatni a rendeltetési helyére.

A mezőgazdaságban a kutatók elsősorban olyan élelmiszernövények nemesítésére használják a CRISPR módszert, amelyeknél korábban túl bonyolult, vagy túl költséges lett volna a genetikai módosítás, de bevetik olyan fontosabb növényeknél is, amelyeknek már van GM-változata.

A *DuPont* vállalatnál a kutatók már dolgoznak a kukorica, szója, olajrepcé, rizs és búza CRISPR-Cas9-szerkesztett változatain. Ezek a növények új tulajdonságokkal rendelkeznek, például szárazságtűrők és magasabb a hozamuk – mindkét tulajdonság kritikus fontosságú, tekintettel az éghajlatváltozásra, valamint arra, hogy a világ népessége gyorsabban nő, mint az élelmiszertermelés.

Új innovációs lehetőséget kínál azonban a genomszerkesztés, mely idegen DNS beépítése nélkül történik, ezért az így nemesített növényt, állatot nem indokolt GMO-ként kezelni.

Az iránymutató uniós GMO-definíció is kivételt tesz három nemesítési módszer: a *mutagenézis*, a *sejtfúzió* (protoplaszt fúzió) és a *poliploidizáció* esetében. A genomszerkesztés, a precíziós nemesítés pedig nem más, mint irányított mutagenesis. Tehát a jelenlegi EU direktíva szerint a genomszerkesztésből származó nemesítés termékeibe nem történik idegen gén beépítése, és így *nem tekintendők GMO-szervezeteknek*.

Ez is indokolja, hogy 2018-ban csatlakoztunk az Európai Akadémiák Tudományos Tanácsadó Testületének (EASAC) állásfoglalásához, amely ésszerűbb, a genomszerkesztési módszerek valódi lehetőségeihez és kockázataihoz igazodó szabályozást sürget.

A géntechnológiai módosítás helyszínei

- Sejtmag- (genom) DNS
 - Plasztisz-DNS
 - Mitokondrium-DNS
- } → extrakromoszómális tulajdonságok, anyai öröklésment

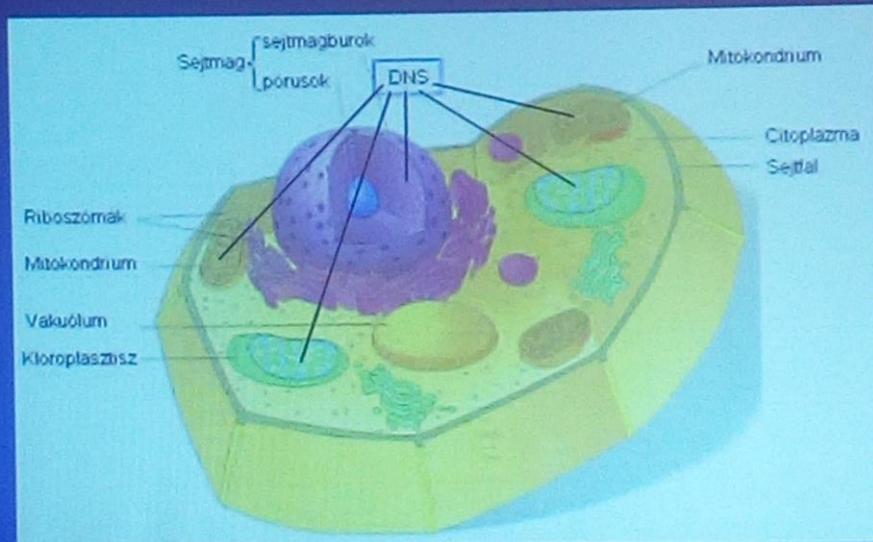
géntechnológiai szempontból a sejt = a növényvel!



sejtekből *in vitro*, növények regenerálhatók

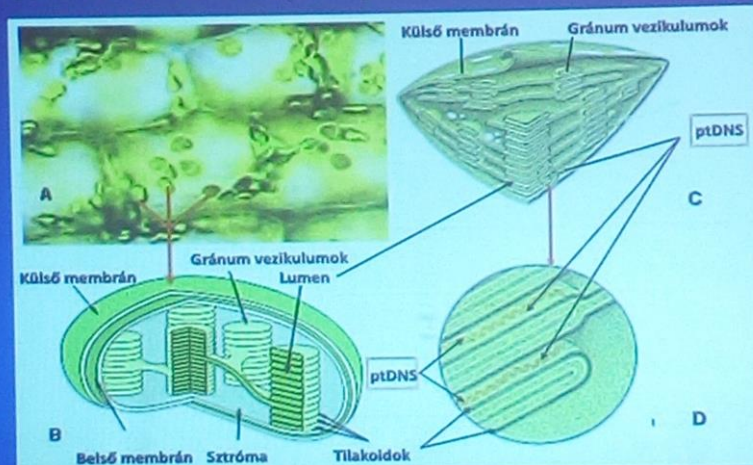
A növényi sejtben a sejtmagon kívül a mitokondrium és a kloroplasztisz is tartalmaz genetikai információt hordozó DNS-t

(R. Lewis 1995. Beginning of the life. WC.B. Boston nyomán)



**A: kloroplasztiszokat tartalmazó fotoszintetizáló sejtek,
B: a kloroplasztisz felépítése, a fotoszintézis a gránum „zsákocskáiban” (vezikulumok) történik,
C,D: a kloroplasztisz DNS (ptDNS) számos kópiája a gránumlemezek között helyezkedik el**

(E.J. Garner és mts. 1991. Principles of genetics, John Wiley and Sons, New York)



A kloroplasztisz-transzformált GM növények által előállított értékes molekulák

- gyógyászati alapanyagok (tripszín),
- monoklonális antitestek (immuno- globulin) és
- ehető vakcinák (kolera ellen immunitást biztosító fehérje).

A gyógyszeripari alapanyagot termelő transzgénikus növény szántóföldi termesztése számtalan előnnyel jár:

- Hasznosítja például a természet erőforrásait (napfény, csapadék).
- Kisebb környezeti terhelést jelent, kevesebb szennyező anyagot termel, mint a hagyományos fermentor.
- A növény magjában, szemtermésében szintetizálódó rekombináns fehérje hűtés nélkül is hosszú ideig stabil, jól tárolható.
- A vakcina-antigént termelő növény további előnye, hogy a hatóanyag tisztítás nélkül is alkalmazható, használata nem igényel injekciós tűt, melynek megsemmisítése költséges.

Pharming for Pharmaceuticals / „Molecular farming”

Kloroplasztisz-transzformált GM növények

- Fontos, hogy az idegen molekula nagy tömegben termelődjön, a termék könnyen gyűjthető, szállítható és raktározható legyen.
- Az első gyógyászati célra használható fehérjét (emberi növekedési hormont) termelő GM dohányt 1986-ban állították elő.
- Napjainkra több ezer tudományos közlemény jelent meg, melyek több mint száz gyógyításban használható molekula előállításáról és alkalmazásának eredményeiről szólnak (hormonok, immunoglobulin, interferon, interleukin, növekedési faktor, humán autoantigének, valamint vírus és baktériumok elleni antigének).
- A növényben, illetve annak kloroplasztiszában termelt fehérjék közül sokat klinikai vizsgálatokban is ellenőriztek, s az eredmények nagyon biztatóak.

Magyarországon a kutatások ehető vakcina előállítására irányulnak:

- Az immunizálásra szolgáló, betegséget nem okozó bakteriális eredetű fehérjéket transzgénikus rizsvonalakban szintetizáltatták.
- Bizonyították, hogy a GM rizs szemtermésében elegendő mennyiségű rekombináns antigén fehérje termelődik ahhoz, hogy néhány gramm nyers rizs elfogyasztása megfelelő számú ismétlésben védelmet nyújtson *E. coli*- vagy kolerafertőzéssel szemben.
- állatoknál törekednek a szövetspecifitásra
tejbe kiválasztható legyen

Felmérések a biotechnológiai módszerek elfogadásáról

- Japánban a laikusok véleménye jelentősen változott (*Jobban támogatja!*)
- Csökkent azok száma akik elutasítják (*világviszonylatban nőtt*)
 - Nőtt azok száma, akik úgy vélik, hogy a biotechnológia csökkenti az éhezést a világon.
 - **Legismertebb** alkalmazás a betegségeknek ellenálló gabonafajták kialakítása volt (herbicid-, vagy rovar rezisztencia).
 - **Legelfogadottabb** alkalmazás az emberi-gének baktériumokba való bejuttatása volt vakcinák és gyógyszerek termeltetése céljából (*inzulin!*)
 - Külön vizsgálták, hogy az egyes területeken hogyan ítélik meg az emberek a várható előnyöket és kockázatokat.
 - Legtöbbször: klónozás és genetikailag módosított élelmiszerek kockázatát tartják

Biotechnológiai módszerek elfogadása

- *Legjobb* a fogadtatás a *humán-terápiás* géntechnika alkalmazása terén → sokan tekintik új fegyvernek a *rák elleni* küzdelemben és más eddig gyógyíthatatlan betegség terén.

- Németek ellenállása a legnagyobb minden vonatkozásban.
- A médiák felelősége óriási !!!

Genetikailag módosított szervezetek

GMO (*genetically modified organism*)

- Genetikai anyaga nem természetes úton változott meg (nem a párosodást követő rekombináció útján)
 - a géntechnológia eszközei által idegen DNS szakasz bejuttatása
 - általában cél az expresszió

A transzgénikus vagy genetikailag módosított (GM) növények előállításának főbb lépései

1. Génizolálás
2. Vektorba építés (a vektorok bakteriális plazmidok, amelyek promotert, kódoló szakaszt, terminátort, marker- és riportergéneket tartalmaznak)
3. Géntranszfer (indirekt: *Agrobacterium tumefaciens*,
direkt: pl. génpuska)
4. A transzformánsok szelekciója
5. A transzgénikus növények regenerálása
6. A transzgénikus növény vizsgálata laboratóriumban, üvegházban
7. A transzgénikus növények szántóföldi tesztelése
8. Fajtabejelentés
9. Transzgénikus növények forgalmazása

Az előállítás és felhasználás célja

- Éhezés megállítása (pl. hozamnöveléssel)
- Hiánybetegségek megszüntetése
- Betegségek gyógyítása
- Környezetkímélő technológiák
- Új ipari technológiák

Technológiai célok

• biotikus stressz rezisztencia (vírus, gomba, baktérium, rovar) és abiotikus stressz rezisztencia (herbicidek) kialakítása - első generációs növények

- Herbicidek rezisztencia - Roundup Ready szója
- Rovar ellenállóság - „BT kukorica”
- Betegség ellenállóság - Burgonya Y vírus

• a növény anyagszerkezetének (szénhidrát, zsírsav, fehérje) és fejlődésének (érés, himsterilitás, stb.) módosítása - második generációs növények

- Hozam növelése
- Vitamingazdagság - arany rizs A vitamin
- Allergén mentesség - glutén mentes
- Feldolgozás - kenyértészta elasztikusság javítása
- Eltarthatóság - „polcos” paradicsom

GM növények termeszto területének változása 1996-2012 hatásmechanizmus szerint (millió ha, millió acre)

Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2012:
By Trait (Million Hectares, Million Acres)



Source: Clive James, 2012

Agyógyszeripari alapanyagot termelő transzgénikus növény szántóföldi termesztése

kisebb környezeti terhelést jelent, kevesebb szennyező anyagot termel, mint a hagyományos fermentor.

- Ehető vakcinák (pl. kolera ellen immunitást biztosító fehérje).
- A növény magjában, szemtermésében szintetizálódó rekombináns fehérje hűtés nélkül is hosszú ideig stabil, jól tárolható.
- A vakcina-antigéneket termelő növény további előnye, hogy a hatóanyag tisztítás nélkül is alkalmazható, használata nem igényel injekciós tűt, melynek megsemmisítése költséges.

További előny: Hasznosítja a természet erőforrásait (napfény, csapadék).

Fontos, hogy az idegen molekula nagy tömegben termelődjön, a termék könnyen gyűjthető, szállítható és raktározható legyen.

A növényben, ill. kloroplasztiszában termelt fehérjék közül sokat klinikai vizsgálatokban is ellenőriztek, s az eredmények nagyon biztatóak.

Pharming for Pharmaceuticals / „Molecular farming”

A kutatások ehető vakcina előállítására irányulnak

A bioreaktor transzgénikus növények előállításában óriási jelentősége lesz a jövőben a kloroplasztisz transzformációnak.

- Az immunizálásra szolgáló, betegséget nem okozó bakteriális eredetű fehérjéket transzgénikus rizsvonalakban szintetizáltatják.
- GM rizs szemtermésében elegendő mennyiségű rekombináns antigén fehérje termelődik ahhoz, hogy néhány gramm nyers rizs elfogyasztása megfelelő számú ismétlésben védelmet nyújtson *E. coli*- vagy kolerafertőzéssel szemben.

- állatoknál törekednek a szövetspecifításra (pl. tejbe kiválasztható legyen

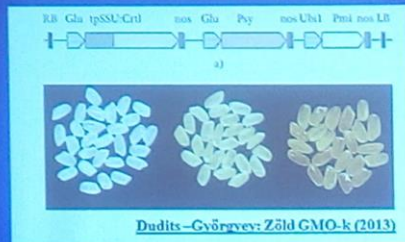


Kloroplasztisz-transzformált GM növények Aranyrizs – Golden Rice 2 (GR2)

A-vitamin hiány Dél- Ázsiában; a rizs alapélelmiszer.

A β -karotin (A-vitamin előanyaga) a levélben szintetizálódik, a rizsszemek alig tartalmazzák.

3 gén bejuttatásával a β -karotin szint növelhető. Az összes karotinoid tartalomból (37 $\mu\text{g/g}$) 31 $\mu\text{g/g}$ β -karotin.



Jelentős géntechnológiai fejlesztés, hazánkban is megváltoztathatja a génmésített növények megítélését.

Utószó

Az emberi természet sajátja, hogy használja mindazon ismereteket és eszközöket, melyek rendelkezésére állnak. Az emberiség története során mindig is ezt tette. A biotechnológiával sem lesz másképp (Prof. Heszkiy László).

Hosszú távon nem tehetünk mást, mint elfogadjuk James D. Watson Nobel-díjas professor ajánlását:

„Meg kell tanulnunk együtt élni a DNS-ről szerzett tudásunkkal”.

Akit érdekel a téma....

Genetikailag módosított élőlények
(GMO-k) a tények tükrében

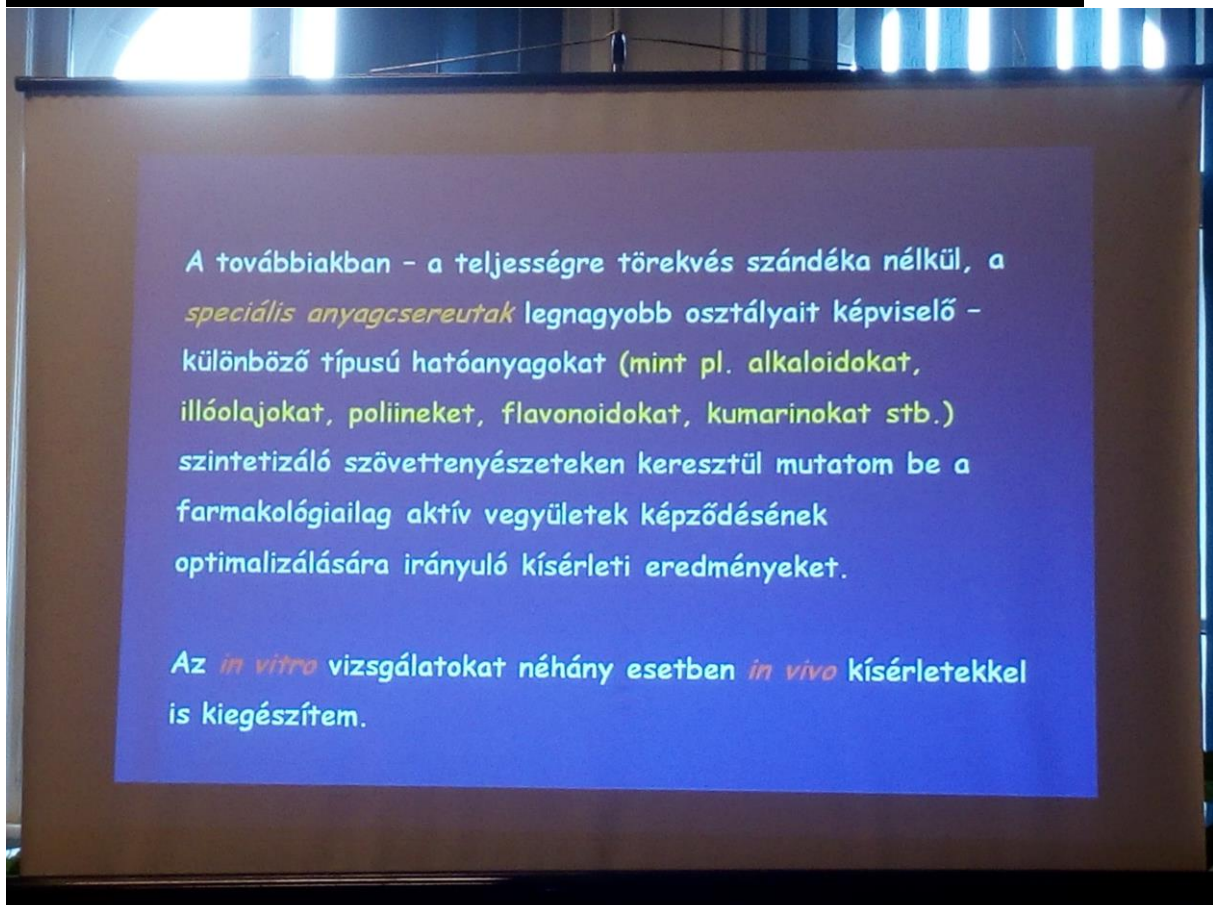
Magyar Fehér könyv

Szerkesztők:

Balázs Ervin, Dudits Dénes, Sági László

SZEGED, 2011

7. előadás (04.29)



BIOGENETIKAI RENDSZER

1. Szacharidok

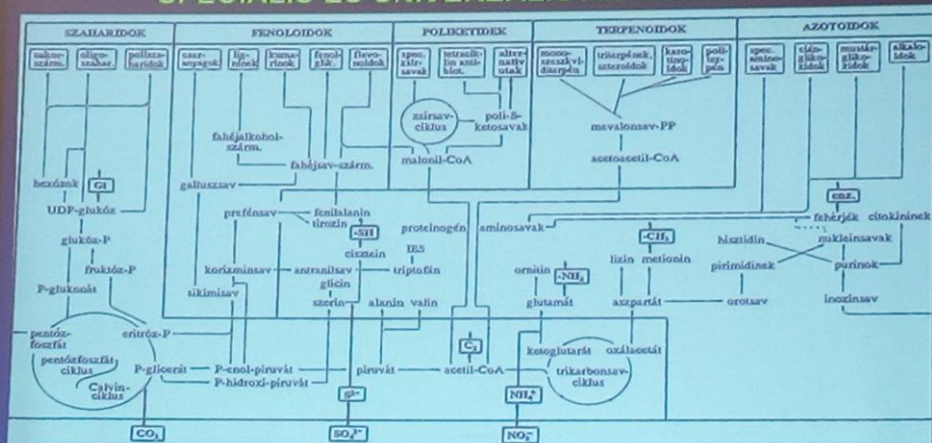
2. Fenoloidok

3. Poliketidek

4. Terpenoidok

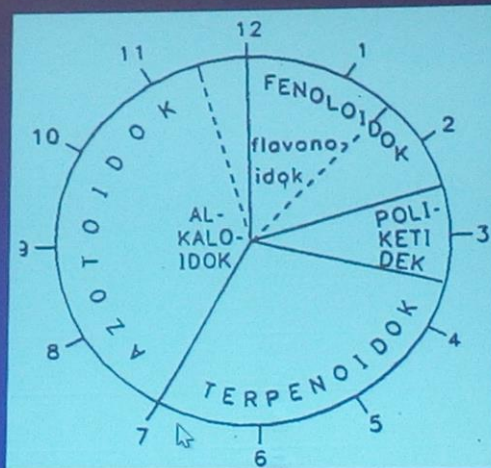
5. Azotoidok

SPECIÁLIS ÉS UNIVERZÁLIS ANYAGCSERE



- Az alsó szinten a C, S, N szerves anyagok anyagcserébe beépülése.
- A Calvin ciklushoz és a trikarbonsav-ciklushoz, továbbá ezeket összekötő **piroszőlősavhoz** (piruvát) kapcsolódik az aminosavak bioszintézise és a nukleotid bázisok (purinok, pirimidinek) képződése.
- A speciális anyagcsere utak kapcsolódása az univerzális anyagcseréhez

AZOTOIDOK a növényvilágban



Növényi hatóanyagok megoszlása
(LUCKNER nyomán)

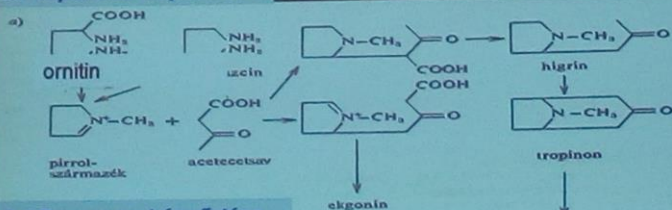
TROPÁNVÁZAS
alkaloidokat tartalmazó drogok

SOLANACEAE növények alkaloidtartalma

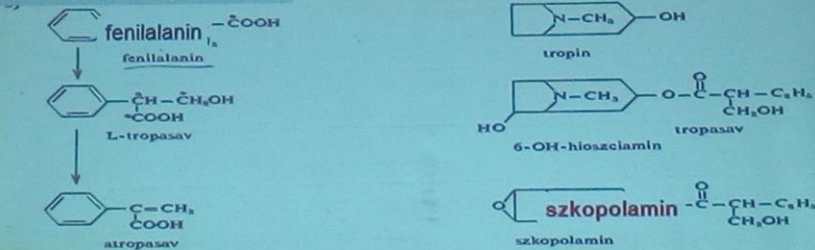
A növény megnevezése	Alkaloid (%)	Főalkaloid
<i>Atropa belladonna</i> gyökér levél termés	0,6 0,4 0,2	hioszciamin
<i>Hyoscyamus niger</i> herba (levél, szárral, virágokkal, vagy terméssel)	0,04	hioszciamin
<i>Hyoscyamus muticus</i> levél és virágzat	1,5	hioszciamin
<i>Scopolia carniolica</i> , <i>Scopolia japonica</i>	0,8	szkopolamin
<i>Datura stramonium</i> varietásai var. tatula, var. stramonium, var. godroni, var. inermis levél	0,25	hioszciamin
<i>Datura innoxia</i> ipari ágvégek	0,30	szkopolamin
<i>Datura metel</i> varietásai var. metel, var. rubra, var. Nuricata	0,4 – 0,6	szkopolamin

Tropán alkaloidok bioszintézise

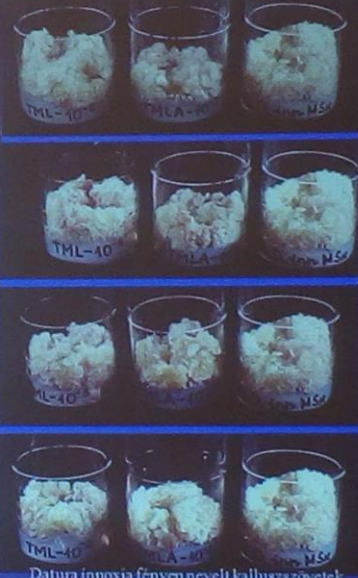
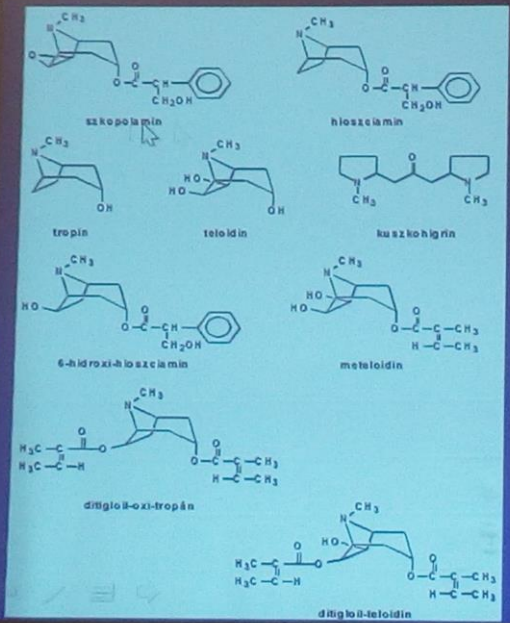
a./ Topánváz képződése



b./ Tropasav képződése



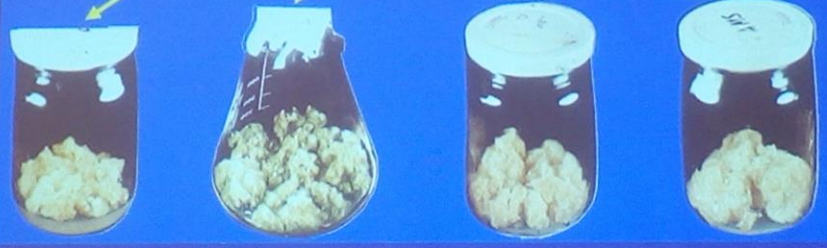
32. ábra. Tropán alkaloidok bioszintézise
a: tropánváz képződése; b: tropasav képződése

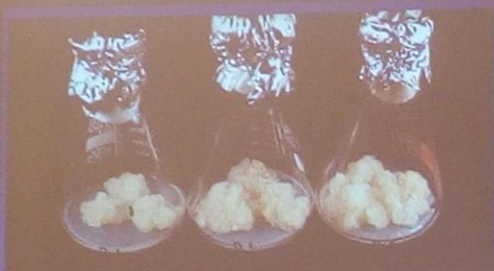


Datura innoxia fényen nevelt kalluszcsovetek
 10^{-3} - 100 mg/l trimetilizint (TML) ill. trimetilizint és L-arginint (TMLA) tartalmazó MS táptalajon nevelve



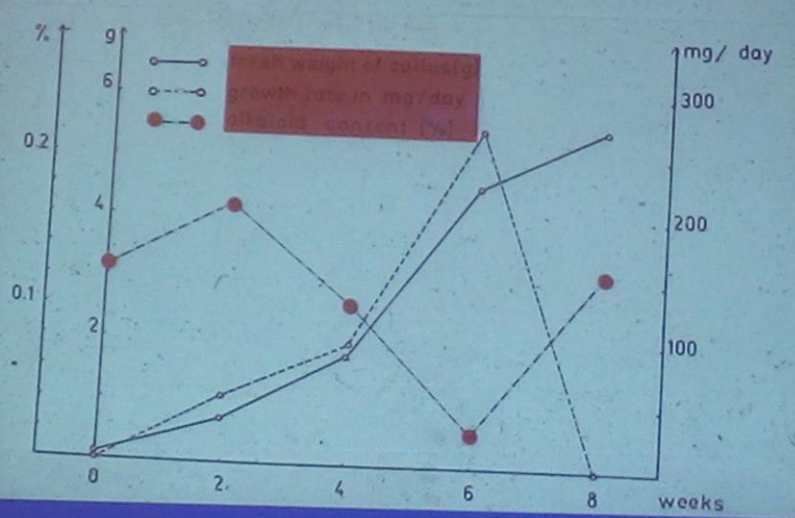
Gyökér Levél Szirom Magház

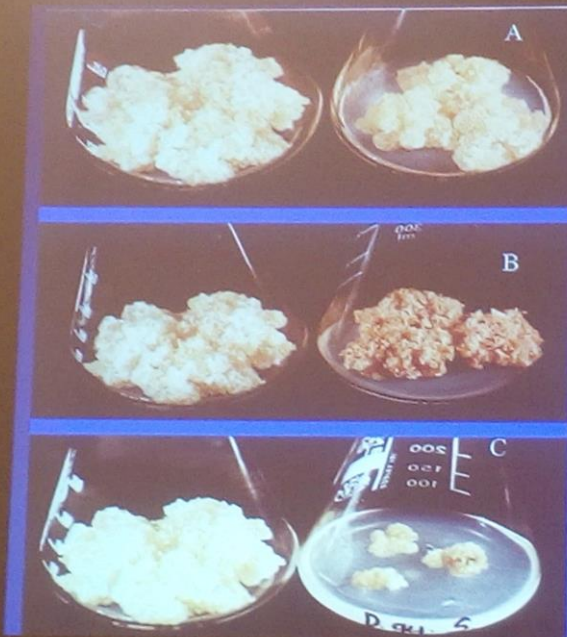




1 - 2 hetes kalluszsövet
 2 - 4 hetes kalluszsövet
 3 - 6 hetes kalluszsövet
 4 - 8 hetes kalluszsövet
 5 = Szuszpenzió
 6 = Szkopolamin + hioszciamin
 Kifejlesztő elegy: Söti szerint
 Előhívó: Dragendorff

CHANGES IN ALKALOID CONTENT AND GROWTH OF ROOT CALLUS TISSUES DURING THE INCUBATION TIME



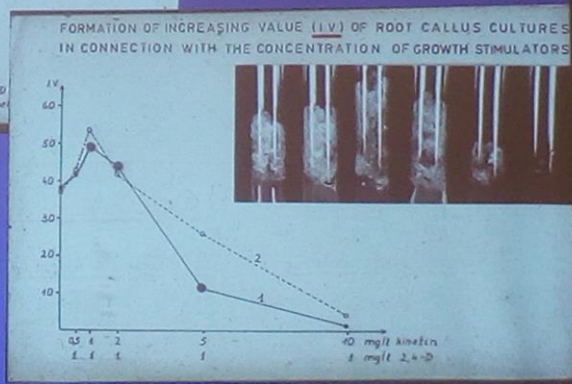
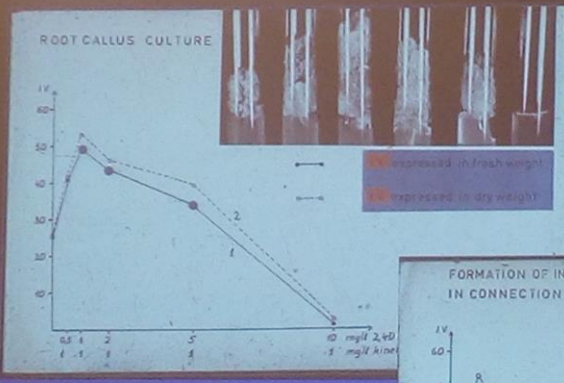


Sötétben nevelt *Datura innoxia* gyökér kalluszsövet

balra: 1 mg/l kinetin és
1 mg/12,4-D;

jobbra: A: 1 mg/12,4-D,
B: 1 mg/1 kinetin,

C: hormonmentes táptalajon

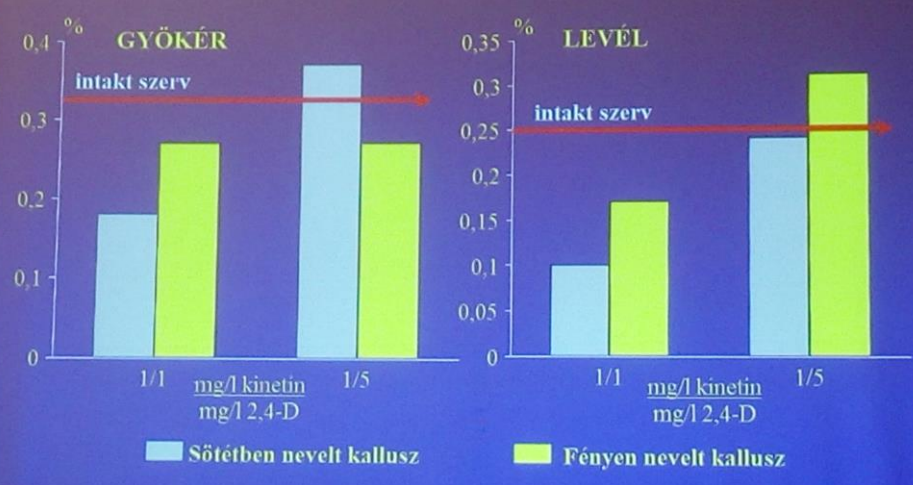




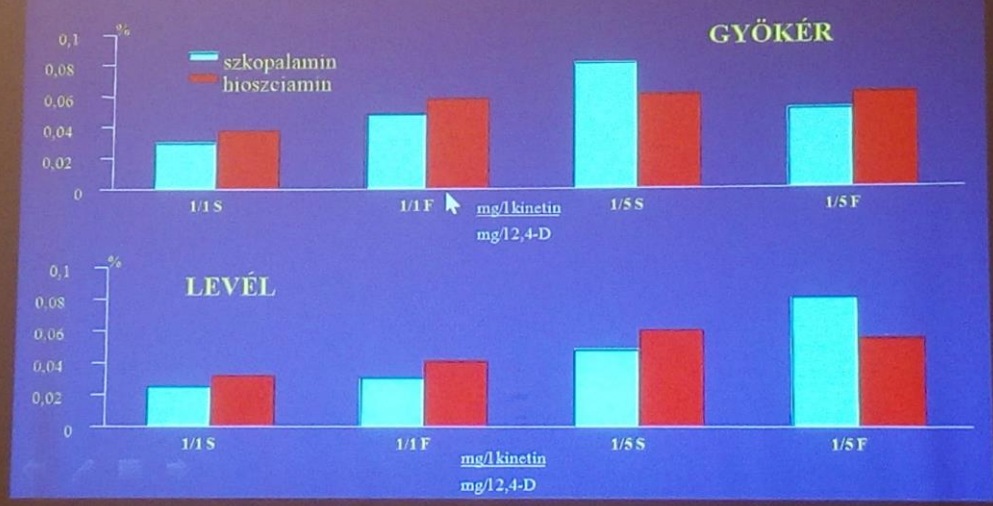
- 1 = 1mg/l kinetin + 1mg/l 2,4-D
- 2 = 2 mg/l kinetin + 1 mg/l 2,4-D
- 3 = 1 mg/l kinetin + 2 mg/l 2,4-D
- 4 = 1 mg/l kinetin + 5 mg/l 2,4-D
- 5 = Szkopolamin + hyoszciamin

Kifejlesztő elegy: Solti szerint
 Előhívó: Dragendorff

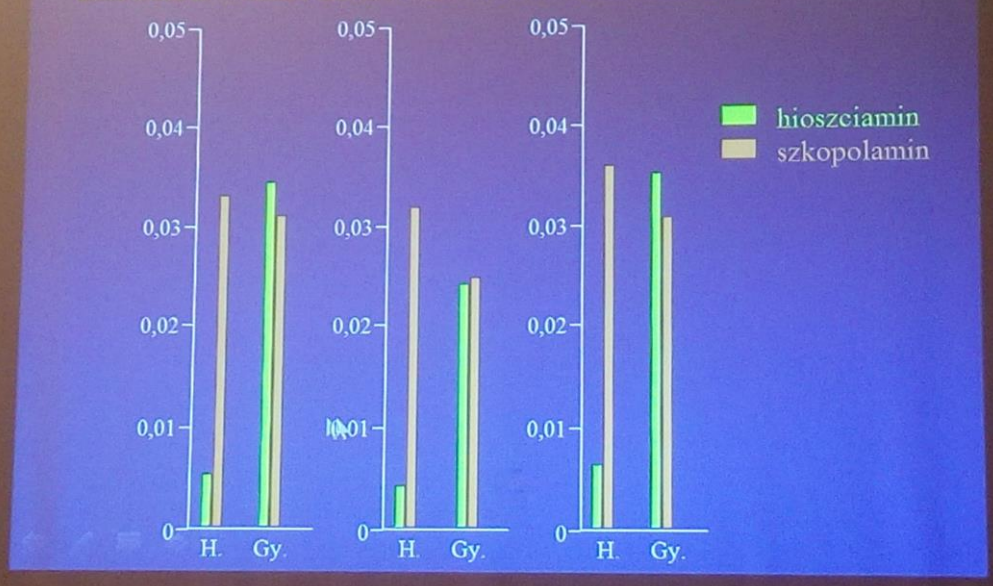
MEGVILÁGÍTÁS HATÁSA A DATURA INNOXIA MILL. GYÖKÉR- ÉS LEVÉLEREDETŰ KALLUSZSZÖVETEK ALKALOIDTARTALMÁRA



MEGVILÁGÍTÁS HATÁSA D. INNOXIA KULTÚRÁK ALKALOID TARTALMÁRA
(S=sötét; F=fény)

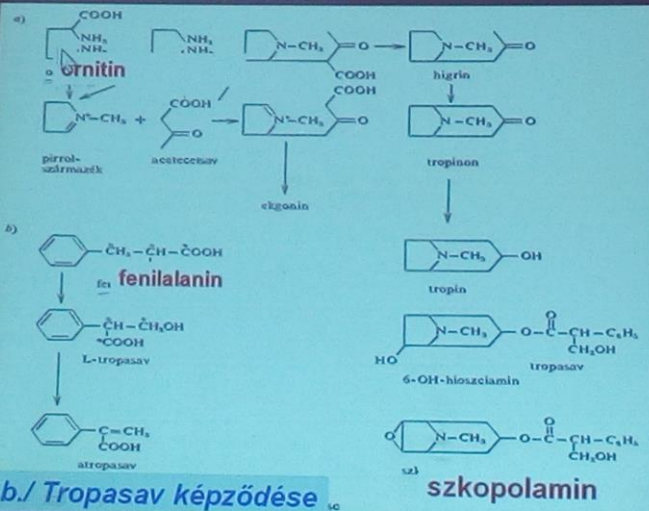


DATURA INNOXIA ORGANIZÁLT KULTÚRA ALKALOID TARTALMA

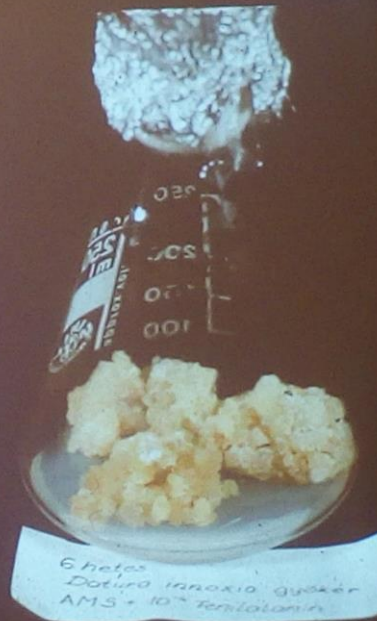
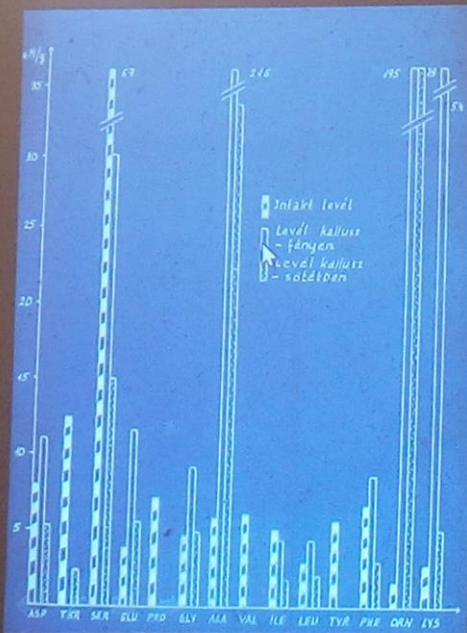


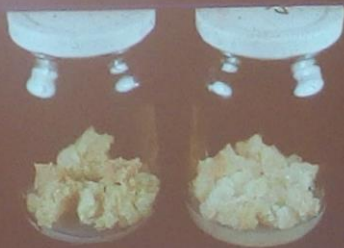
Tropán alkaloidok bioszintézise

a./ Topánváz képződése

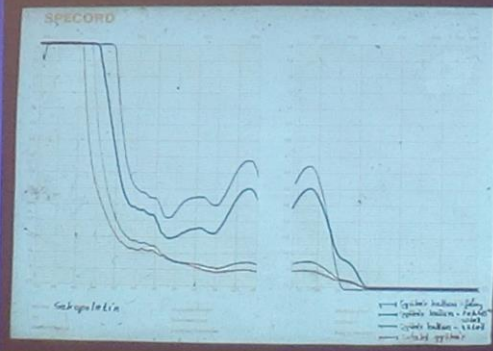


b./ Tropasav képződése





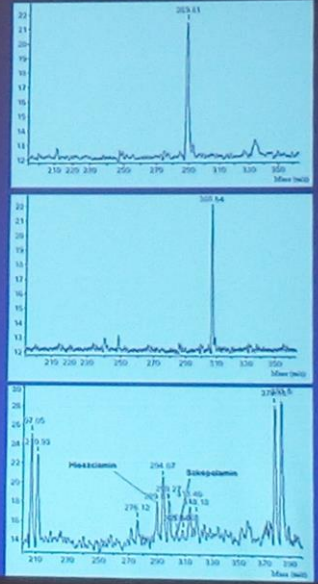
- | | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|
- 1 Inlakt gyökér
 - 2 gyökér kallusz-szövet-AMS
 - 3 gyökér kallusz-szövet-O'fen
 - 4 Szkopolelin
- Kifejlesztő elegy
toluol-etilformiát-hingyészav
(5+4+1)
UV-fény (366 nm) ~



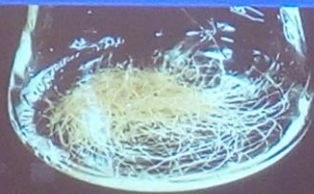
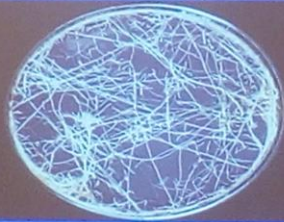
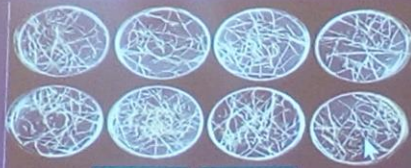
ORVOSI MASZLAG (DATURA INNOXIA Mill.)



MALDI-MS

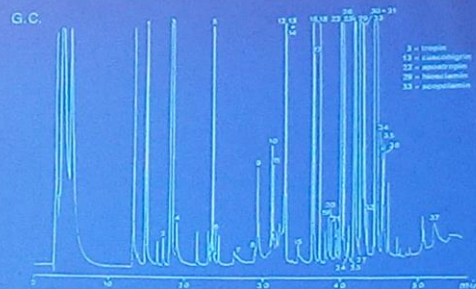
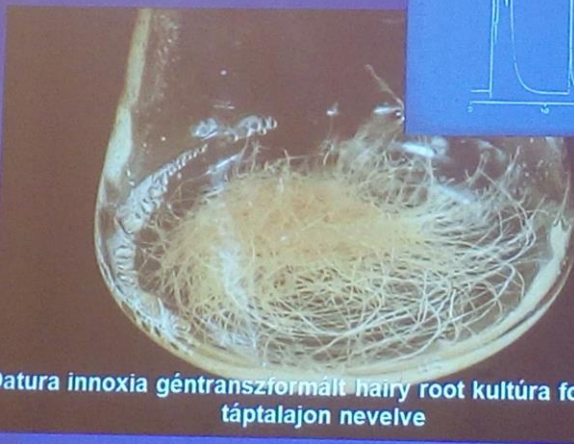


László I. *Acta Horticulturae* (2001) 597. 265-270
Plant Growth Regulation (1998) 25. 195-199. IR: 0,750

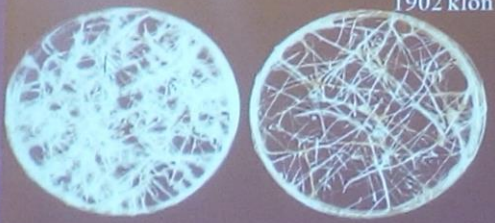


Datura candida x *D. aurea*
hairy root klónok (Y-A4)

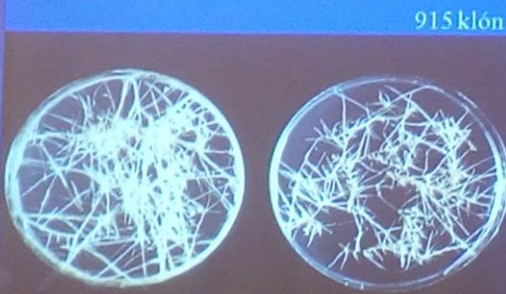
MS hormonmentes szilárd és
folyékony táptalajon nevelve



Datura innoxia géntranszformált hairy root kultúra folyékony
táptalajon nevelve

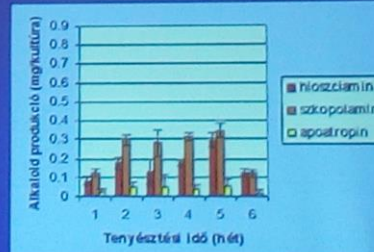
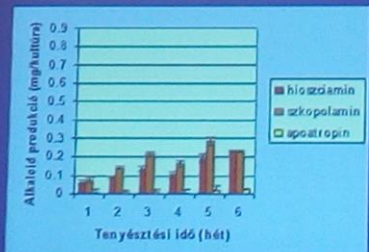
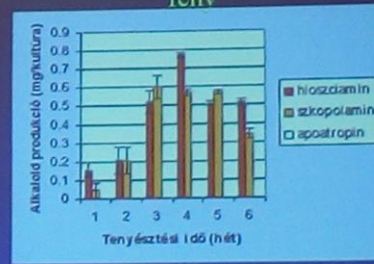
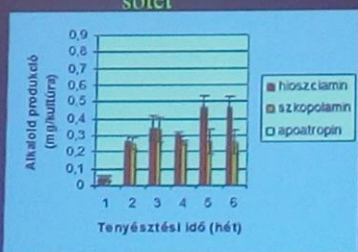


Datura innoxia (N-9402 A.r.)
 hairy root klón
 MS (bal) és
 Gamborg B-5 (jobb)
 táptalajon nevelve

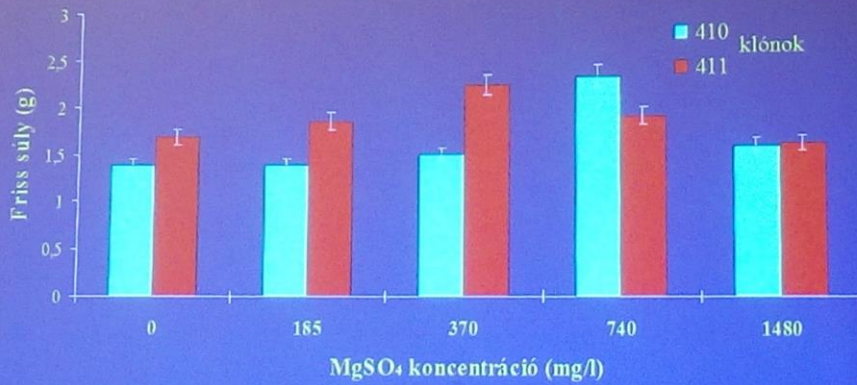


Datura candida x D. aurea
 (N-9402 A.r.) hairy root klón
 MS (bal) és Gamborg B-5 (jobb)
 táptalajon nevelve

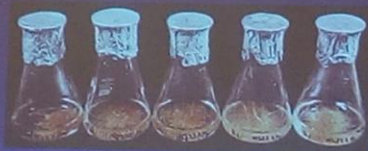
Datura innoxia hairy root klónok (410, 411) alkaloid produkciója
 sötét fény



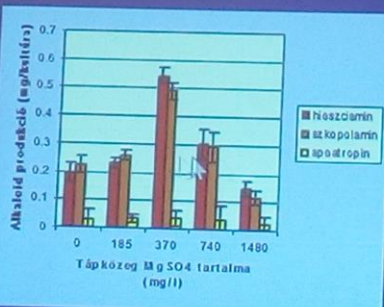
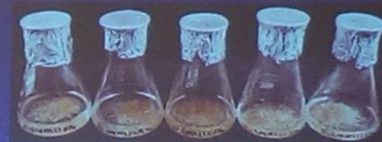
*MgSO₄ HATÁSA DATURA INNOXIA MILL.
HAIRY ROOT KLÓNOK (410, 411) NÖVEKEDÉSÉRE*



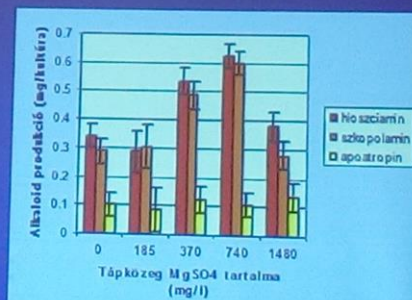
*Datura innoxia hairy root klón (410) alkaloid produkciójának
változása MgSO₄ hatására*



410 klón

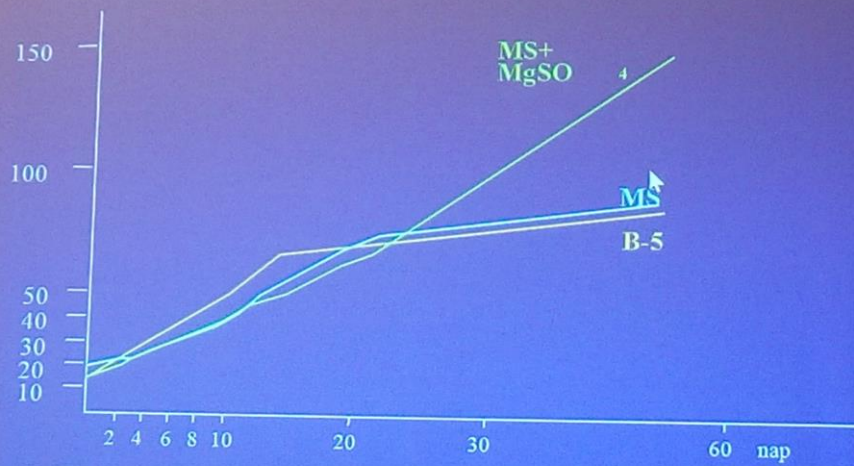


sötét



fény

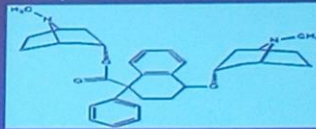
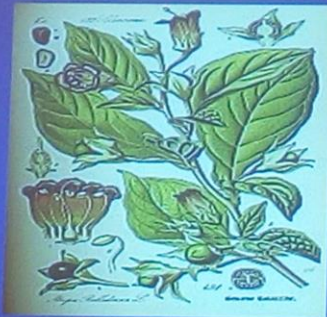
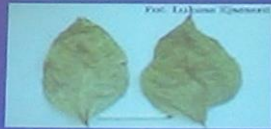
*D. ATURA CANDIDA x D. AUREA HIBRID HAIRY ROOT KULTÚRA
(A.r.A4) NÖVEKEDÉSE MAGNÉZIUM HATÁSÁRA*



Belladonnae radix et folium

Belladonnae radix et folium
(Solanaceae)

Atropa belladonna L.



Belladonnae radix et folium
(Solanaceae)
Atropa belladonna L. Nadragulya

gyökere és levele a drog

Tartalmaz:

- alkaloidot (gyökér: 0,3-0,8%, levél: 0,2-0,5%)
hioszciamin,
szkopolamin,
apootropin,
kuszkohigrin,
beladonnin
- kumarinok (szkopoletin, szkopolin)
- flavonoidok

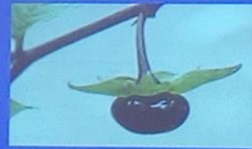
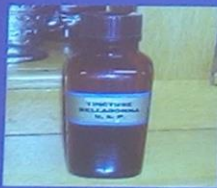
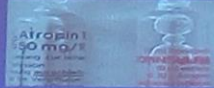
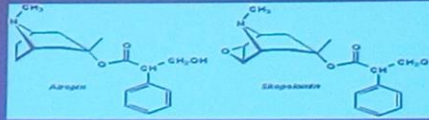
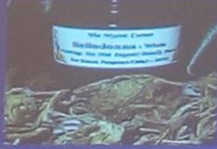
Szárítás során

a hioszciamin ---- atropinná racemizálódik

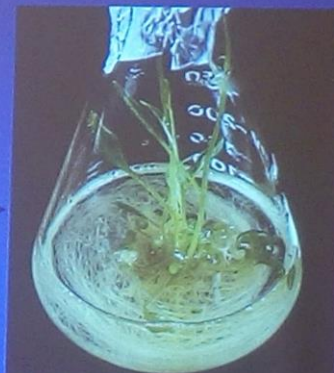
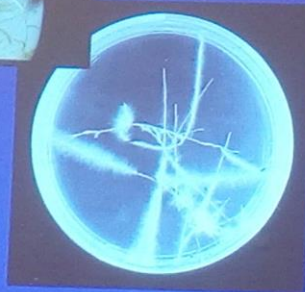
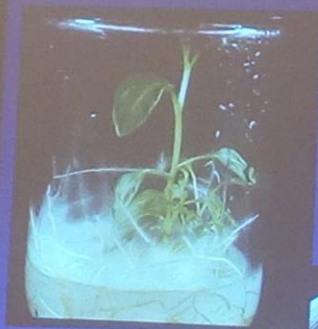
Hatás – paraszimpatolitikus,
pupilla tágító (szekréciót csökkenti)

XVI.száz olasz nők (*Bella donna*)

Atropin tartalmú készítmények



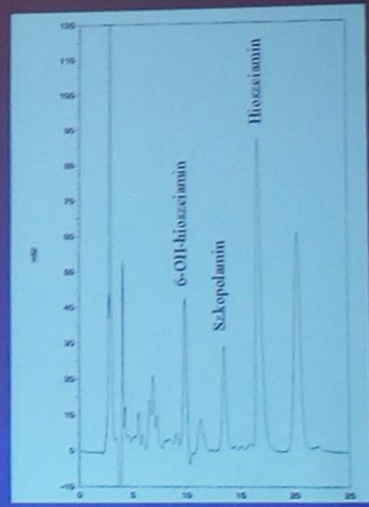
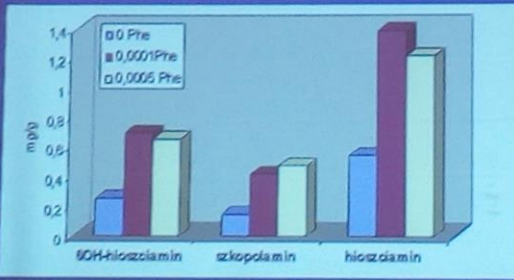
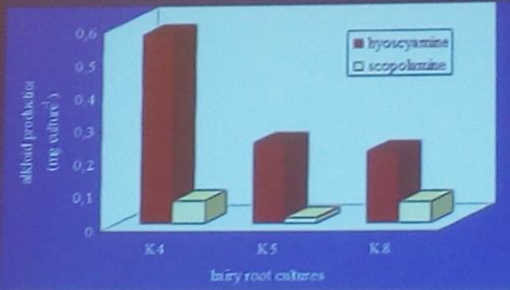
Transzgénikus *Atropa belladonna* L. kultúrák alkaloid produkciója



Hank Hajnalka

Acta Horticulturae (2001) 597, 271-274.

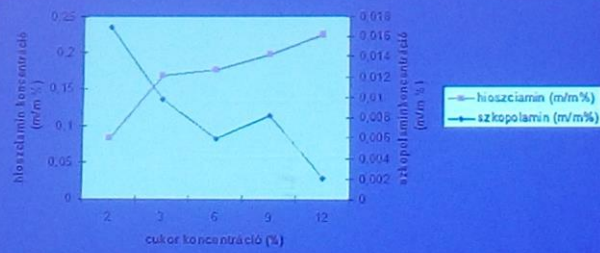
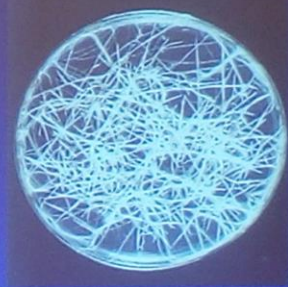
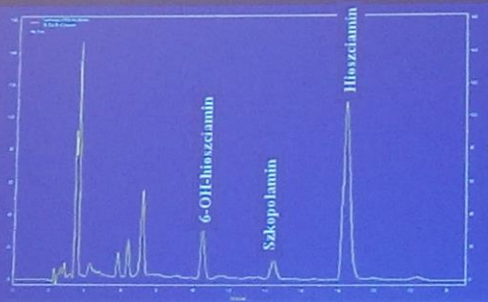
Hairy root klónok alkaloid tartalma



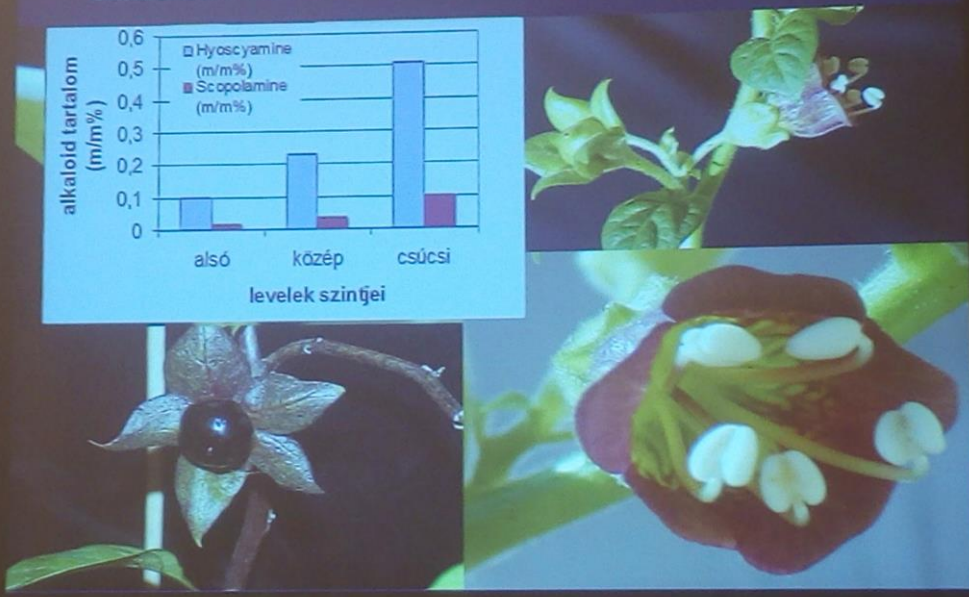
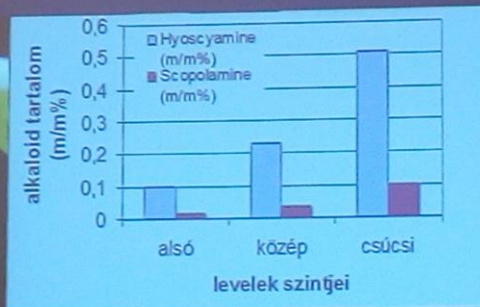
Alkaloid prekursor Phe hatása K8# hairy root alkaloid tartalmára

Chromatographia, 2004 1E: 1,23 Kursinszki

Szacharóz hatása a hairy root kultúrák alkaloid tartalmára

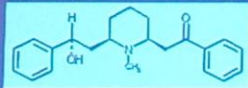


Géntranszformált *A. belladonna* növények (#K4, #K5, #K8 klónok)



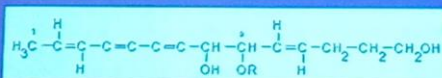
Lobelia inflata L. géntranszformált hairy root kultúrák hatóanyag termelésének fokozása

Alkaloidok (piperidin vázas-)
 Összalkaloid tartalom: 0,4 %
 Lobelin tartalom: 0,05 %



lobelin

Poliacetilének (antivirális, HIV ellenes)
 Lobetiolin: 0,091%
 Lobetilolinin: 0,067%

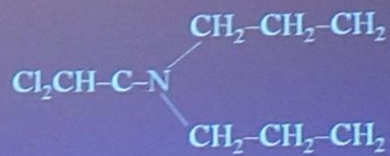


lobetiol: R=H
 lobetiolin: R=glükóz
 lobetilolinin: R=genciobióz



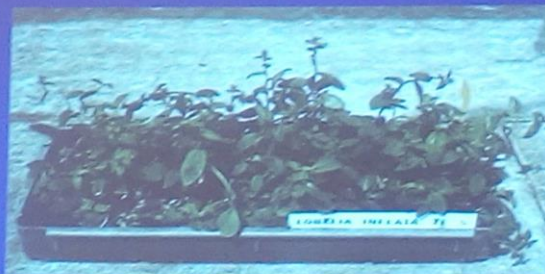
Bálványos István

In vitro és *in vivo* *L. inflata* kultúrák



TI - 35

N-/diklór-acetil/-hexametilén-imin



**Lobelia inflata *in vivo* nevelt kultúra
(5 mg/l TI-35)**

SURVIVAL %

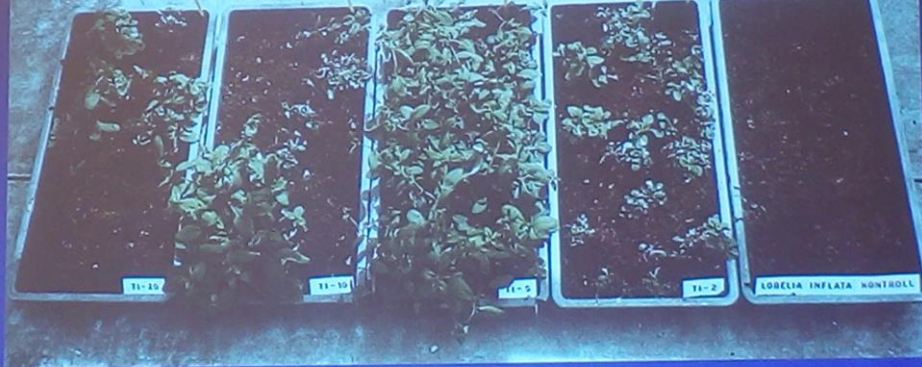
27

36

94

43

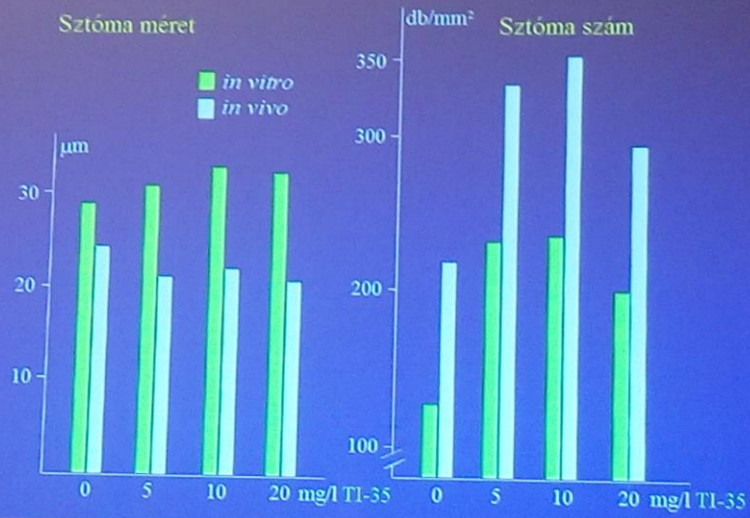
0



CHLORO-ACETYL-HEXAMETHYLENE TI-35

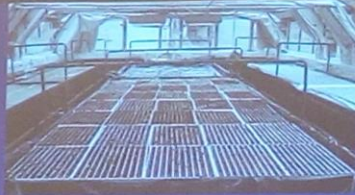


**LOBÉLIA INFLATA ORGANIZÁLT KULTÚRA LEVÉL
FONÁKEPIDERMISZÉN A SZTÓMÁK MÉRETE ÉS SZÁMA**

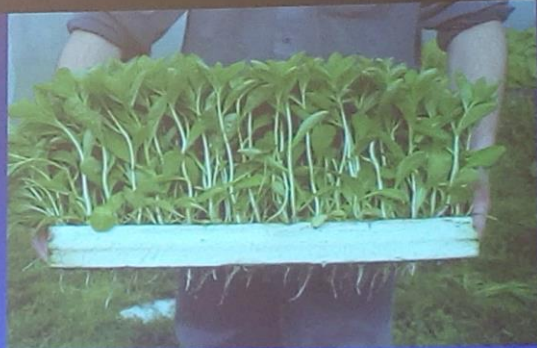


Üvegházi adaptáció





A *Lobelia inflata* palántanevelésére szolgáló vízágy az üvegházban

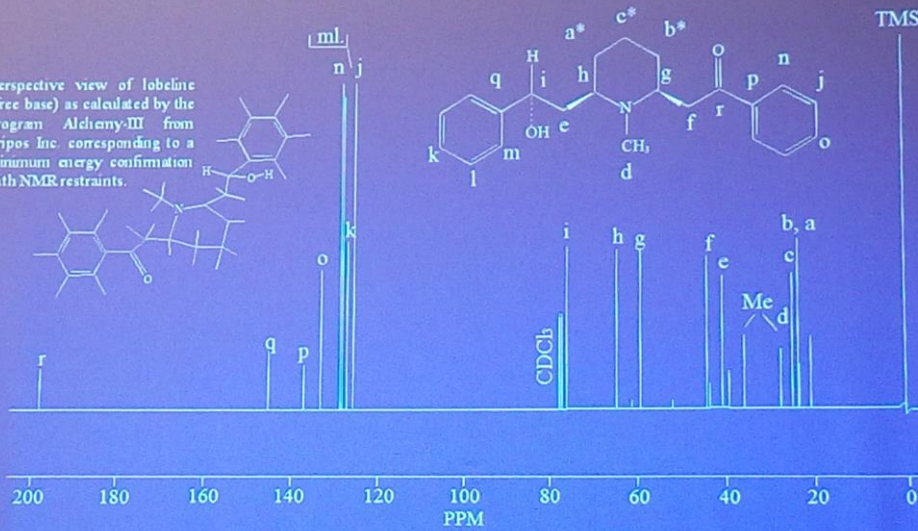


Palánták a sátorból való kiszedéskor

Lobelia inflata betakarítás előtt

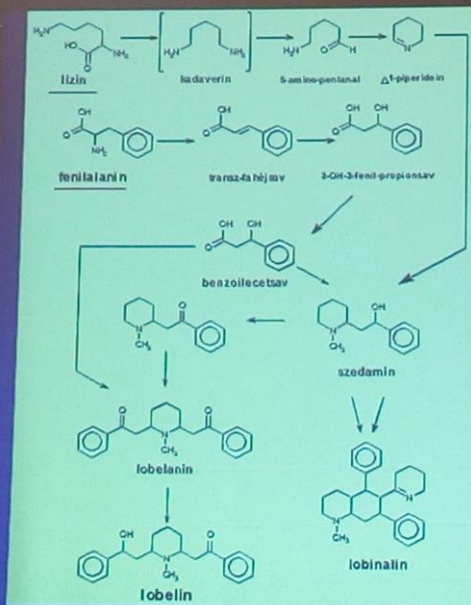
Lobelin C^{13} - NMR SPEKTRUMA

Perspective view of lobeline (free base) as calculated by the program Aldiana-III from Tripos Inc. corresponding to a minimum energy confirmation with NMR restraints.

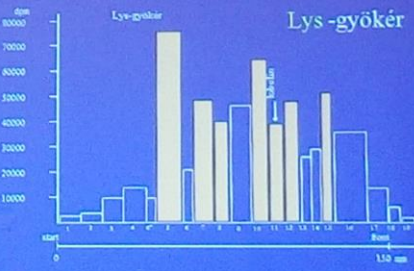
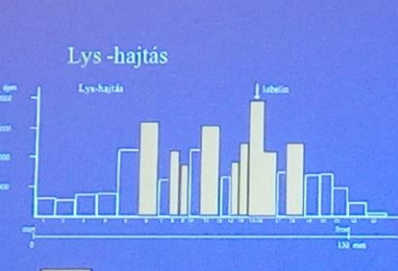
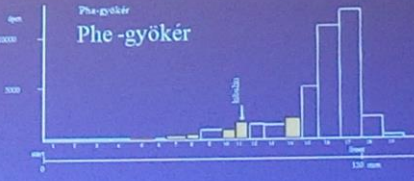
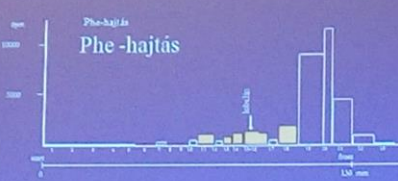


Neszmélyi A.

Medical Journal of Experimental and Clinical Research (1998) 4. 15-19



RADIOAKTÍV FENILALANIN ÉS LIZIN BEÉPÜLÉSE A L. INFLATA ORGANIZÁLT KULTÚRÁK HERBÁJÁNAK, ILL. GYÖKERÉNEK ALKALOIDJAIBA



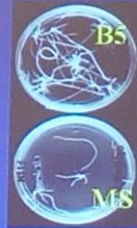
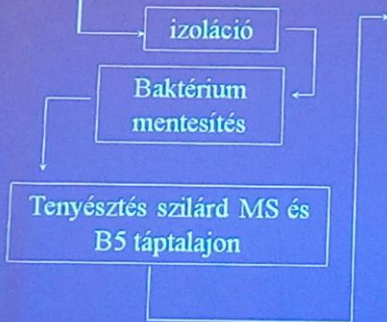
VRK Dragendorff pozitív foltjainak aktivitása

Lobelia inflata hairy root klónok előállítása és vizsgálata



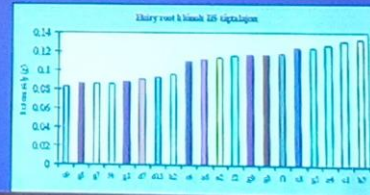
L. Inflata

Fertőzés mikroinjektálással:
Agrobacterium rhizogenes R 1601 törzsszel

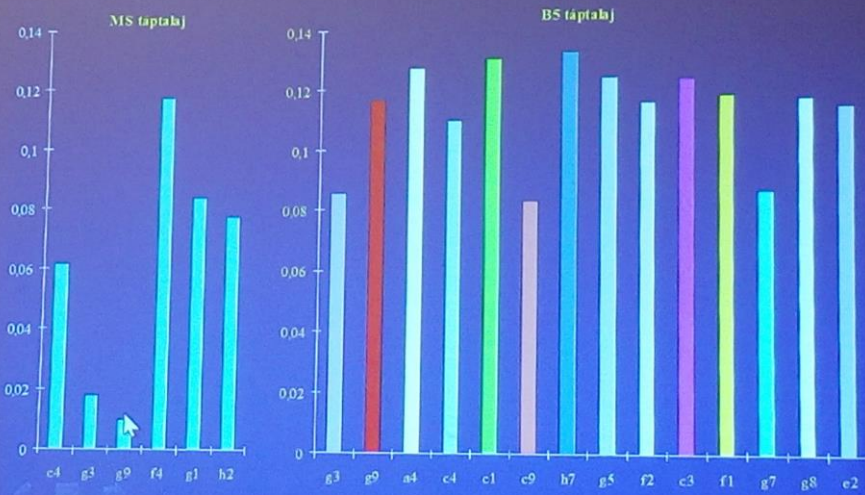


8009/h7 klón

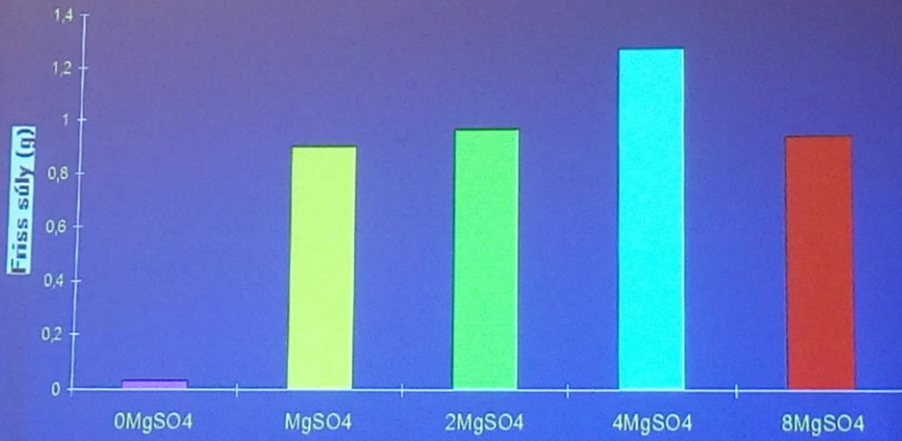
Hairy root klónok
növekedése
B5 szilárd táptalajon



LOBELIA INFLATA HAIRY ROOT KLÓNOK SZÁRAZ TÖMEGE MS ÉS B5 TÁPTALAJON

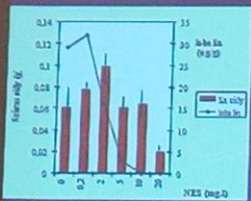


LOBELIA INFLATA HAIRY ROOT KLÓN TÖMEGE $MgSO_4$ (0-2000 mg/l) TARTALMÚ B5 TÁPTALAJJOKON



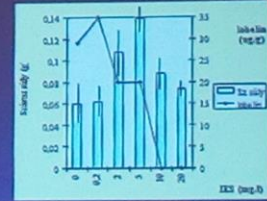
Növekedési regulátorok hatásának vizsgálata

NES



NES (mg/l)	0	0,2	2	5	10	20
lobelin (µg/kultúra)	1,7 ±0,6	2,5 ±0,3	1,5 ±0,2	0,2 ±0,0	-	-

IES

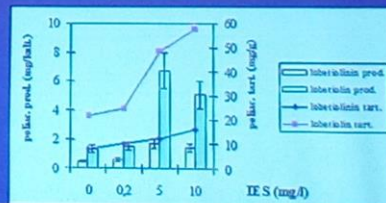


IES (mg/l)	0	0,2	2	5	10	20
lobelin (µg/kultúra)	1,7 ±0,6	2,1 ±0,4	2,2 ±0,4	2,8 ±0,2	-	-

száraz súly és lobelin tartalom

Lobelin (µg/cult.)

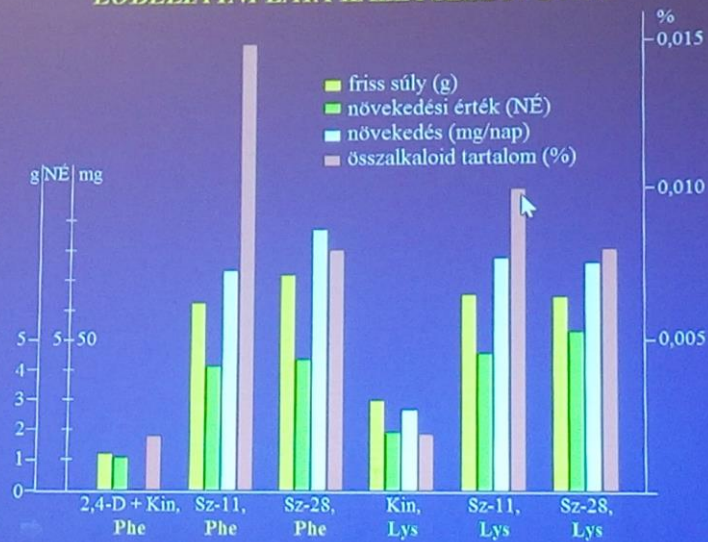
poliacetilén tartalom (mg/g) és poliacetilén (mg/kultúra)



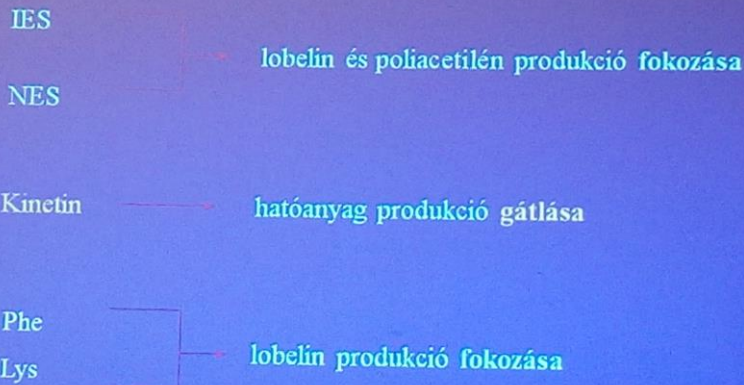
LOBELIA INFLATA KALLUSZSZÖVETEK SZABAD AMINOSAVTARTALMA



REGULÁTOROK ÉS AMINOSAVAK (10^{-4} M) HATÁSA A LOBÉLIA INFLATA KALLUSZSZÖVETRE



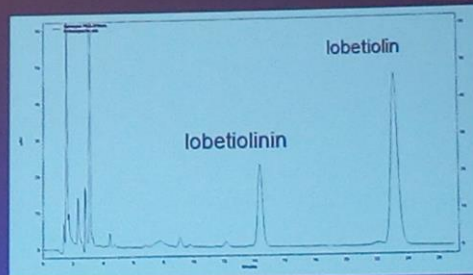
Hormonok és alkaloid prekursor aminosavak hatásának összefoglalása



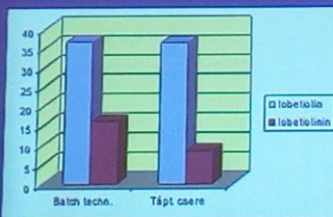
Lobelia inflata hairy root kultúrák tenyésztése bioreaktorban



#8009/h2 klón



Poliacetilének HPLC analízise *Lobelia inflata* hairy root kultúra (#8009/h7) kivonataiban



- Batch technológia
- Táptalaj csere

Poliacetilén tartalom (mg/g) változása
(15% kioldódik a táptalajba)

Acta Horticulturae (2001) 597. 253-256.
Chromatographia, 2004 IF.: 1,23

Balványos
Bányai

Rauwolfia serpentina gyökere szolgáltatja a drogot

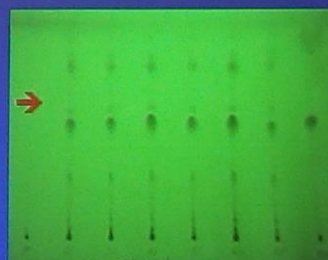
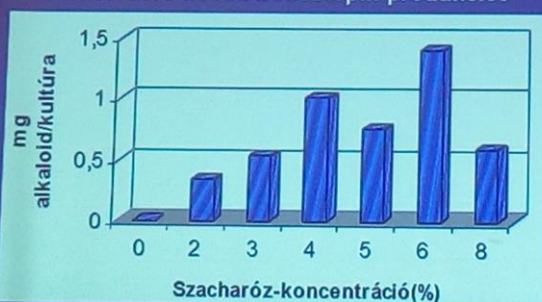


- Több mint 50 alkaloidot tartalmaz
- yohimbinvasas származékok
- Vérnyomáscsökkentő:
 - reszerpin
 - szerpentin
 - ajmalin, stb.
- Pszichotróp hatású, depressziót idéz elő:
 - reszerpin

Rauwolfia serpentina hair root kultura

A tenyészetek reszerpin-tartalma (0,3%)
duplája az *in vivo* növény gyökerében (0,14%)

- A szacharóz-tartalom növelése
- 2-szeresére emelte a reszerpin-tartalmat
- 4-szeresére növeli a reszerpin-produkciót



Secenji Mária és László Imre