

Produktion af det bio-aktive stof fra broccoli i gær

Broccoli er sundt, det ved de fleste. Mange er tilmed klar over, at broccoli kan forebygge visse former for kræft. Alligevel spiser den brede befolkning for små mængder broccoli til at opnå den kræftforebyggende effekt. Det aktive stof i broccoli hedder glucoraphanin, og produktion af glucoraphanin i store mængder har et stort potentiale i forebyggelse af kræft. I denne artikel beskrives et igangværende speciale, som ved brug af gær som produktionsorganisme har til formål at opnå store mængder glucoraphanin.

Af specialestuderende Jan Kjølhede Vester, Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

De fleste kender desværre én eller flere, som har haft kræft tæt inde på livet. Af samme årsag forskes der i stor stil i bekæmpelse af kræftsygdomme. Der er overordnet set to strategier til at bekæmpe kræft:

Den første strategi er at bekæmpe kræft, efter at sygdommen er opstået. Det involverer f.eks. kemoterapi og bortoperation af svulster. Bioteknologisk forsøger man bl.a. at udvikle teknikker, så man specifikt kan ramme kræftceller, mens kroppens raske celler forbliver uskadede. Den anden strategi er at forhindre kræft i at opstå. Forebyggelse indbefatter bl.a. de velkendte råd om at spise sundt, dyrke motion og undgå rygning.

Både fra et humanistisk og økonomisk perspektiv vil det optimale være at forhindre kræft i at opstå frem for at behandle, efter at sygdommen er brudt ud. Det er netop målet med projektet, som denne artikel omhandler: at reducere antallet af nye kræfttilfælde. Det skal opnås via en bioteknologisk drejning af det velkendte råd: "spis sundt".

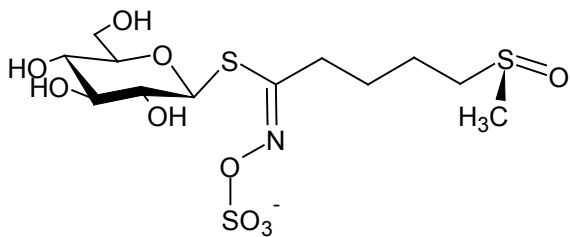
Epidemiologiske studier indikerer kraftigt, at en kost med et højt indhold af grøntsager fra korsblomstfamilien (bl.a. broccoli) reducerer forekomsten af flere typer kræft (Figur 1). Effekterne er hovedsageligt blevet tilskrevet disse grøntsagers indhold af en stofgruppe ved navn glucosinolater. Glucosinolater er svovlholdige naturstoffer, som er årsag til den velkendte smag af sennep og radiser. Planterne producerer dem for at kunne forsvare sig mod angribende insekter og mikroorganismer. Ud over at være forsvarsstoffer for planter har disse stoffer



Figur 1. Broccoli indeholder glucosinolatet glucoraphanin, som menes at være ansvarlig for broccolis kræftforebyggende egenskaber. Foto: <http://www.sxc.hu>

kræftforebyggende effekt hos mennesker. Denne effekt ses især for broccoli, hvor det primære glucosinolat hedder glucoraphanin (Figur 2). Det vil derfor være gavnligt at spise meget broccoli. Til trods for myndighedernes anbefalinger om at spise mere grønt er indtaget af broccoli i den brede befolkning stadig på et niveau, der er langt under det, der kræves for at opnå den kræftforebyggende effekt.

En måde at ændre på dette er at berige kosten med glucoraphanin for på den måde at opnå det krævede indtag. Desværre er glucoraphanin meget svært at isolere fra broccoli og desuden prohibitivt dyrt at fremstille syntetisk.



Figur 2. Glucoraphanin er det primære glucosinolat i broccoli. Glucosinolater er sekundære metabolitter i planter af korsblomstfamilien. De syntetiseres ud fra aminosyrer og indeholder svovl og nitrogen samt en glucoseenhed.

Det ville derfor være godt at kunne producere glucoraphanin i store mængder uafhængigt af planter.

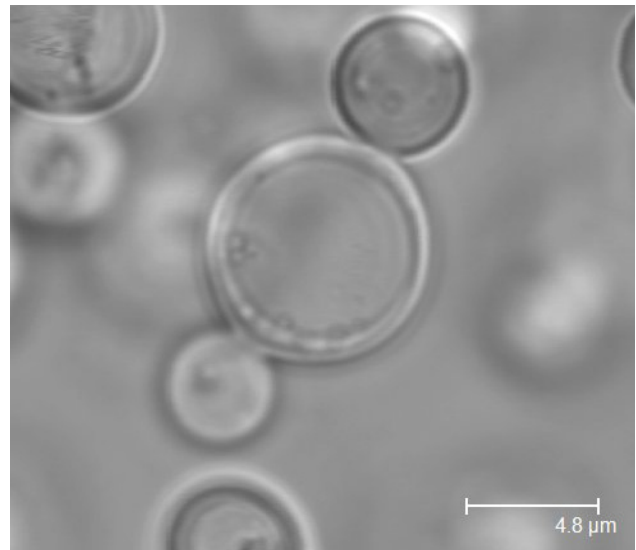
På Det Biovidenskabelige Fakultet ved Københavns Universitet (KU-LIFE) er det lykkedes at producere glucoraphanin i tobaksplanten *Nicotiana benthamiana*, som ikke indeholder glucosinolater naturligt. Tobak er ikke spiselig, men forsøget viser, at det er muligt at overføre biosyntesevejen for glucoraphanin til tobak. Det er derfor oplagt at gå videre og forsøge at producere glucoraphanin i en organisme, der er specialist i at producere fremmede stoffer i store mængder, og som er nem at arbejde med.

Almindelig øl- og bagegær (*Saccharomyces cerevisiae*, Figur 3) besidder netop de ønskede egenskaber. F.eks. er det *Saccharomyces cerevisiae*, som Novo Nordisk benytter til at producere insulin til behandling af diabetes. Udover at være god til at producere store mængder af fremmede stoffer har *Saccharomyces cerevisiae* en anden stor fordel: det er en modelorganisme. Det vil sige, at den har været brugt til forskning gennem mange år. Den er derfor meget velbeskrevet, hvilket gør det lettere at modificere den på den ønskede måde.

Ovenstående er grunden til, at gær er blevet valgt til at producere det kræftforebyggende stof glucoraphanin i dette projekt. De gener, som er involveret i biosyntesen af glucoraphanin i broccoli, findes også i modelplanten *Arabidopsis thaliana*. Det gener fra *Arabidopsis*, der er brugt i dette projekt.

Biosyntese af glucoraphanin

Glucoraphanin syntetiseres ud fra aminosyren methionin. Først omdannes methionin til den korresponderende α -ketosyre (Figur 4). Denne reaktion katalyseres af enzymet **BCAT4**. Herefter kædeforlænges α -ketosyren to gange af enzymerne **MAM1**, **AC1/2**, **IPMDH** og **BCAT3**, så der dannes dihomomethionin. Denne proces finder sted i plantens kloroplaster (grønkorn). Dernæst transporteres dihomomethionin ud i cellens **cytosol**, hvor resten af enzymerne findes og glucoraphanin dannes. **Co-ekspressionsanalyser** samt data fra mutanter viser, at proteinet, der er ansvarlig for transport hen over kloroplastmembranerne, efter al sandsynlighed er **BAT5**. Dels er genet, som koder for BAT5, udtrykt samtidig



Figur 3. *Saccharomyces cerevisiae* er bedre kendt som almindelig bagegær og bruges også til fremstilling af øl. Billedet viser gærceller, der er i færd med at dele sig ved knopskydning. Foto: Michael Hansen

med de andre gener, som er involveret i biosyntesen af glucoraphanin, dels dannes der meget mindre glucoraphanin i planter (knock-out mutanter), der ikke udtrykker BAT5. Der kræves dog mere detaljerede analyser af transportfunktionen, før BAT5's rolle er endelig bevist.

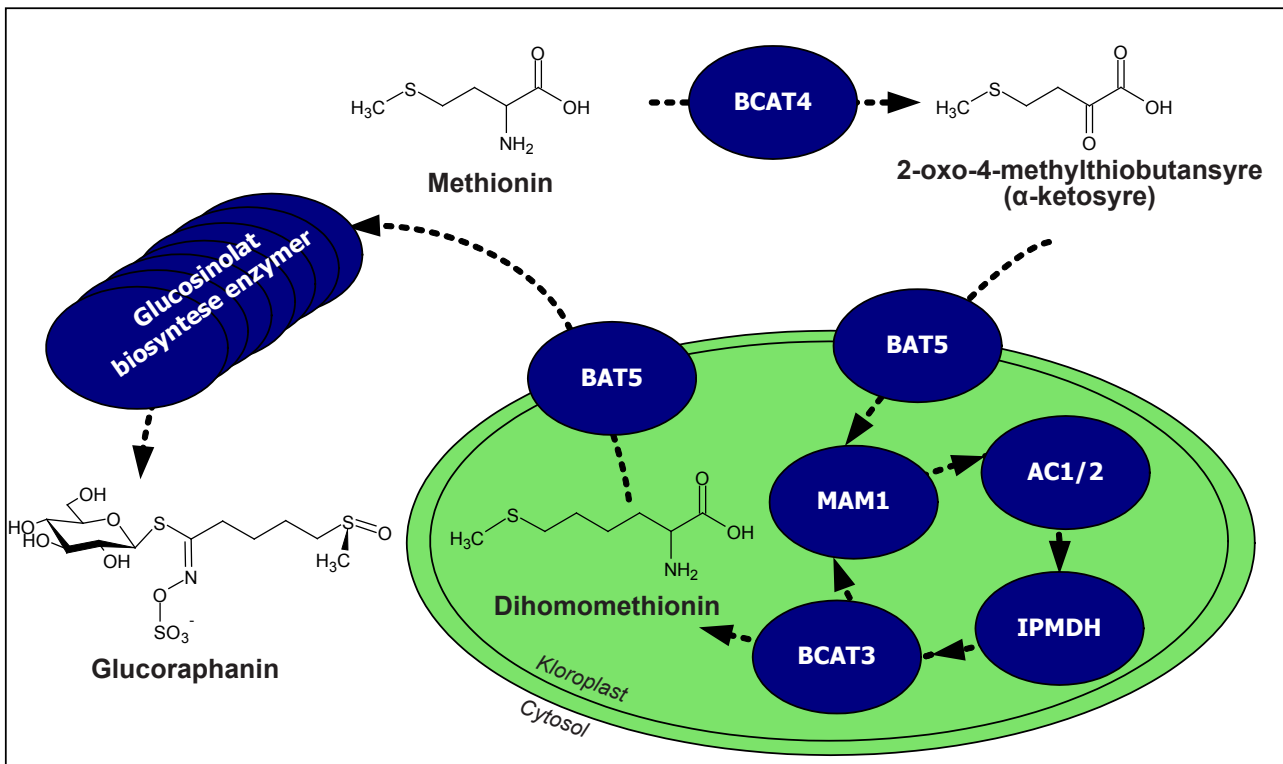
Udfordringer

Som illustreret i figur 4 findes nogle af de enzymer, som er involveret i biosyntesen af glucosinolater, inde i plantecellens kloroplaster, mens andre findes i cytosolen. Denne fysiske adskillelse er meget vigtig for korrekt produktion af glucoraphanin. Gær indeholder ikke kloroplaster, og det er derfor nødvendigt at tænke alternativt for at kunne opnå den nødvendige fysiske adskillelse af enzymerne, når de udtrykkes i gær.

Mitokondrier blev valgt som løsning på dette problem. Mitokondrier minder på flere måder om kloroplaster, idet dette organel også er omsluttet af en dobbeltmembran, og pH-værdierne er sammenlignelige. Derfor er gærs mitokondrier et naturligt valg som substitut for plantens kloroplaster. Udfordringen ligger i at få de proteiner, som medvirker til biosyntesen af glucoraphanin, ind i mitokondrierne i gær og ikke mindst, at få dem til at virke i det fremmede miljø.

Eksperimentel fremgangsmåde

Proteiner kan sendes til mitokondrier ved brug af signalpeptider. Det er korte sekvenser af aminosyrer, som ofte findes i den N-terminale ende af et protein. Signalpeptidet fortæller cellen, at dette protein skal i en bestemt retning. Kloroplastproteinerne fra *Arabidopsis* har et signalpeptid for kloroplaster. For at få biosyntesevejen til at fungere i gær, er det nødvendigt at fjerne dette signalpeptid fra plantegenet og erstatte det med et signalpeptid, der sender proteinet til

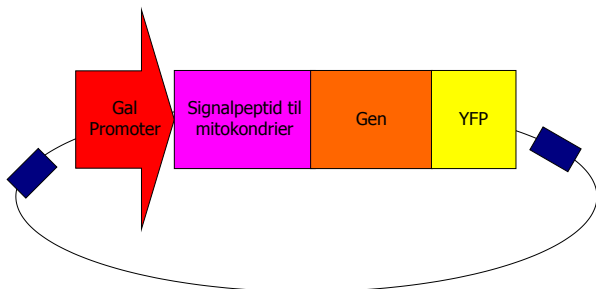


Figur 4. Biosyntese af glucoraphanin i *Arabidopsis thaliana*. Methionin omdannes af enzymet BCAT4 til den korresponderende α -ketosyre, som transporteres af BAT5 ind i plantes kloroplaster. Her kædeforlænges α -ketosyren to gange af fire enzymer til dihomomethionin, som via BAT5 transporteres ud i cytosolen, hvor dihomomethionin omdannes videre til glucoraphanin.

mitokondrierne i gær. Det er også nødvendigt at verificere, at det nye signalpeptid virker, og at proteinet rent faktisk findes i mitokondrier.

En relativt simpel metode til at verificere at et protein udtrykkes et bestemt sted i en celle er at hæfte et markørgen til proteinet (Figur 5). Til dette projekt er et markørgen, som koder for det fluorescerende protein **YFP** (Yellow Fluorescent Protein) valgt. YFP vil udsende **fluorescens**, når det rammes af lys af en bestemt bølgelængde. På den måde kan man i et fluorescensmikroskop se, hvor i cellen YFP og dermed proteinet, som man arbejder med, befinder sig (Figur 6).

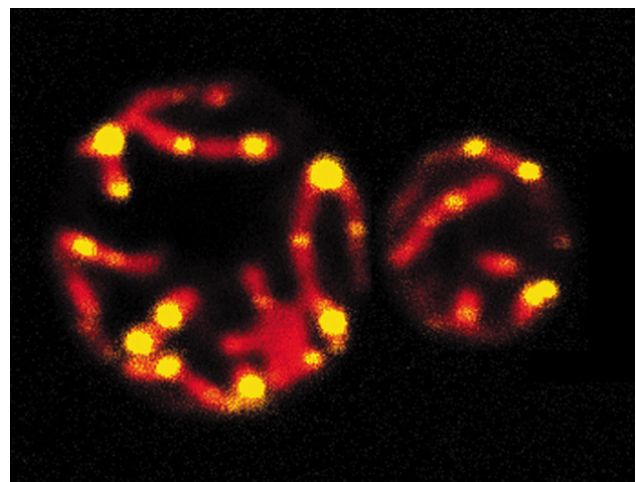
Ud over signalpeptid, interessegen og et markørgen skal man også bruge en **promoter** fra gær for at få proteinet udtrykt. I dette tilfælde er valgt faldet på en galactose



Figur 5. Konstrukt til at få proteiner ind i mitokondrier på gær. "Gen" er i dette tilfælde MAM1, AC1/2, IMPDH, BCAT3 og BAT5. De blå firkanter er sekvenser, der bruges til homolog rekombination i gær.

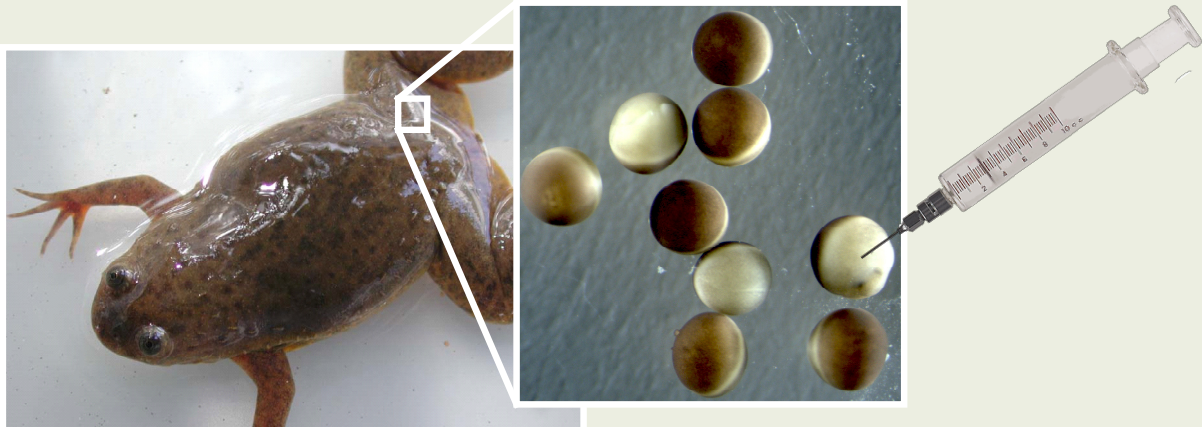
inducerbar promoter (Gal). Med denne promoter kan man styre, hvornår proteinet dannes, idet genet først aktiveres, når gærcellerne overføres til et medium, der indeholder galactose.

Når alle de beskrevne dele er blevet samlet på et plasmid, kaldes det en gen-konstruktion. Selve samlingen af gen-konstruktionen laves i *E. coli* ved hjælp af en særlig metode, som er udviklet ved Institut for Plantebiologi og Bioteknologi. Med denne metode sker der en kontrolleret



Figur 6. Gærceller, hvor mitokondrierne er farvet røde, og et protein med et påhæftet markørgen lyser gult. På denne måde kan man se, om proteinet findes i mitokondrier. Foto: The International Journal of Intracellular Transport. Vol.2 Iss.3, March 2001.

Boks 1. Frøæg bruges til at undersøge transportproteiner



Levende æg (oocytter) fra frøen *Xenopus laevis* er meget anvendelige til at undersøge diverse transportproteiner. I naturen skal oocytterne kunne overleve i en sø med mindst mulig påvirkning fra søens miljø. Derfor har oocytterne meget få transportproteiner i membranen, hvilket gør, at undersøgelserne ikke kompliceres af oocytens egne transportproteiner. Derudover er oocytten klar til at blive til en frø og er derfor udstyret med alle de nødvendige enzymer og substrater, der skal til for at danne nye proteiner.

Det biologiske system i oocytten kan udnyttes ved at injicere mRNA af et transportprotein, som man ønsker at undersøge. Oocytten translaterer mRNA'et til et funktionelt protein, som kan indsættes i oocytens membran. Herefter kan oocytterne inkuberes i diverse detekterbare substrater. Alternativt kan man injicere substrater ind i oocytterne. Ved at analysere indholdsstofferne i oocytten og i inkuberingsmediet, kan man klarlægge, hvilke stoffer, der transporteres ind eller ud.

samling af DNA-fragmenterne ved hjælp af bakteriens enzymer. Plasmidet oprenses fra *E. coli*, og åbnes vha. restriktionsenzymer, og selve gen-konstruktionen transformeres efterfølgende ind i gær med **homolog rekombination**. På den måde kan det præcist kontrolleres, hvor gen-konstruktionen indsættes på gærs kromosomer, idet indsættelsen sker ved overkrydsning mellem to DNA-molekyler med ens sekvenser.

Når alle proteiner er udtrykt i gærs mitokondrier, er det næste trin at undersøge, om gær rent faktisk producerer det ønskede stof, glucoraphanin. Dette gøres med en metode kaldet **LC-MS**, som er i stand til at identificere gær-metabolitter. Den kronologiske arbejdsgang i projektet er dermed:

- Fremstille gen-konstruktioner i *E. coli*.
- Transformere gen-konstruktioner ind i gær med homolog rekombination.
- Undersøge med LC-MS, om det ønskede stof dannes.

Transport over mitokondrie-membraner

Grunden til, at nogle af enzymerne skal udtrykkes i mitokondrier, er som sagt, at den fysiske adskillelse er vigtig for korrekt produktion af glucoraphanin. Men det øger samtidig kompleksiteten, da der dermed er en dobbeltmembran, som specifikke stoffer skal krydse. Transportøren, der udfører dette, er efter al sandsynlighed BAT5. Det er en transportør, som hidtil ikke er blevet beskrevet detaljeret.

En del af projektet er at undersøge BAT5-transportøren i detaljer. Til det formål bruges levende æg (oocytter) fra frøen *Xenopus laevis*. Oocytterne er i stand til at udtrykke et protein, når det kodende mRNA injiceres (Boks 1).

Herefter inkuberes oocytterne i forskellige opløsninger, og efterfølgende undersøges det med LC-MS, hvilke stoffer fra opløsningerne, der er kommet ind i oocytterne, og hvilke der er kommet ud. På den måde opnår man en masse information om, hvilke stoffer BAT5 transporterer og under hvilke forhold.

Perspektiver

Succesfuld produktion af glucoraphanin i gær har et stort potentiale i forbindelse med forebyggelse af kræft. Med gær som produktionsorganisme vil der være skabt en stabil og billig kilde til glucoraphanin. Det vil muliggøre berigelse af fødevarer med glucoraphanin eller indtagelse af stoffet i form af kosttilskud. Ultimativt kunne det ende med at forhindre mange mennesker i at udvikle kræft. Glucoraphanin kan især være til gavn for folk, hvis kost er fattig på grøntsager som broccoli og kål.

Produktion af glucoraphanin i gær vil tillade yderligere undersøgelser af stoffets virkningsmekanismer ved brug af cellekulturer, dyremodeller og sluttelig i mennesker. Positive resultater af disse undersøgelser er en forudsætning for at glucoraphanin kan anvendes til berigelse af fødevarer.

Ordforklaring

AC1/2 (Aconitase 1/2): Enzym som katalyserer en isomerisation.

BAT5 (Bile Acid Transporter 5): Protein, der sandsynligvis transporterer mellemprodukter i glucoraphanin biosyntesen over kloroplastmembranen.

BCAT3/BCAT4 (Branched-Chain AminoTransferase): Enzym, som katalyserer flytning af en aminogruppe (-NH₂).

Co-ekspressions analyse: Analyse, der viser, hvilke gener der er udtrykt sammen.

Cytosol: Væske, der befinder sig inde i cellen, dog ikke i kernen og i organellerne (f.eks. kloroplaster og mitochondrier).

Epidemiologisk studie: Studie af faktorer, der har indflydelse på sundhed og sygdom.

Fluorescens: Udsiktning af fotoner, der resulterer i frigivelse af energi i form af lyssignal.

Homolog rekombination: Overkrydsning mellem to DNA-molekyler i områder, hvor de to DNA-molekyler har samme sekvens.

IPMDH (IsoPropylMalate DeHydrogenase): Enzym som katalyserer en oxidativ decarboxylering, hvilket resulterer i, at molekylet bliver et kulstofatom mindre. Dette kulstofatom frigives i form af CO₂.

LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry): Analysemetode, der fysisk adskiller stoffer og bestemmer deres masse med høj sensitivitet.

MAM1 (Methylthioalkylmalate synthase 1): Enzym, som kondenserer acetyl-CoA.

Promoter: DNA sekvens, der kontrollerer transskriptionen af et gen. Med en inducerbar promoter kan man styre, hvornår genet udtrykkes.

Signalpeptid: Kort sekvenser af aminosyrer, der dirigerer proteiner til et specifikt sted i cellen.

YFP (Yellow Fluorescent Protein): En almindeligt brugt mærker. YFP-genet stammer fra en vandmand.

Referencer

Mikkelsen, M.D., Olsen, C.E., and Halkier, B.A. (2009) Production of the cancer-preventive glucoraphanin in tobacco. Submitted.

Juge, N., Mithen, R.F., and Traka, M. (2007) Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. Cellular and Molecular Life Sciences 64:1105-1127.

Traka, M and Mithen, R. (2008) Glucosinolates, isothiocyanates and human health. Phytochemistry Review 8:269-282.

Geu-Flores, F., Nielsen, M.T., Nafisi, M., Moldrup, M.E., Olsen, C.E., Motawia, M.S., and Halkier, B.A. (2009) Glucosinolate engineering identifies a gamma-glutamyl peptidase. Nature Chemical Biology 5:575-577.

Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H.H., Nielsen, M.T., and Halkier, B.A. (2007) USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. Nucleic Acids Res. 35:e55.

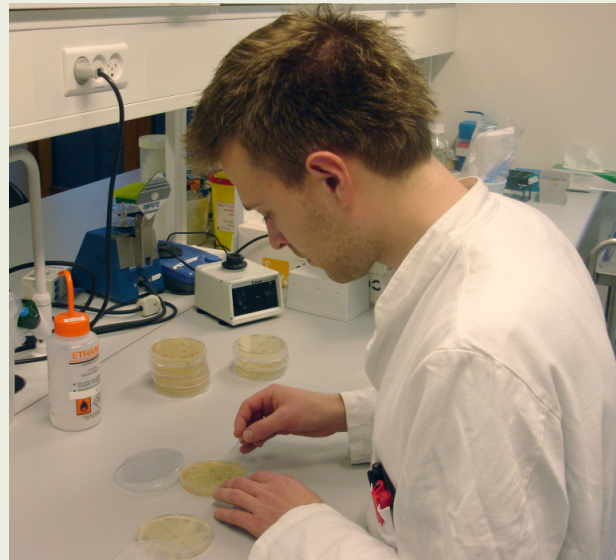
Gigolashvili, T., Yatushevich, R., Rollwitz, I., Humphry, M., Gershenzon, J., and Flugge, U.I. (2009) The Plastidic Bile Acid Transporter 5 Is Required for the Biosynthesis of Methionine-Derived Glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 21:1813-1829.

Boks 2. Igangværende forskning

Det overordnede forskningsprojekt (Bioengineering of yeast for production of the cancer-preventive sulforaphane) om udvikling af en metode til produktion af glucoraphanin i gær er et samarbejde mellem Københavns Universitet (KU-LIFE) og Danmarks Tekniske Universitet (DTU). Professor Barbara Ann Halkier er projektleder. Som en følge af glucoraphanins mange anvendelsesmuligheder er der også store økonomiske perspektiver i produktionen af glucoraphanin. At skabe en gærstamme, som producerer et plantestof, vil udgøre en videnskabelig platform for projekter i utallige retninger.

Delprojektet med udtrykkelse af proteiner i gærs mitochondrier udføres som et specialeprojekt af Jan Kjølhede Vester, der er kandidatstuderende i Biologi-Bioteknologi. Specialet blev påbegyndt 1. september 2009, afsluttes 1. september 2010 og udføres på Institut for Plantebiologi og Bioteknologi med professor Barbara Ann Halkier som vejleder og adjunkt Michael Dalgaard Mikkelsen som medvejleder.

Kontakt gerne Jan Kjølhede Vester (jkv@life.ku.dk) for at høre om mulighederne for et foredrag om projektet.



Jan Kjølhede Vester isolerer transformerede gærceller.