

## ENZYMOLÓGIA TVORBY BENZYLIZOCHINOLÍN- NOVÝCH ALKALOIDOV

BILKOVÁ A., BILKA F., BEZÁKOVÁ L.

Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava

### SÚHRN

#### Enzymológia tvorby benzylochinolínových alkaloidov

Prehľadná práca sumarizuje aktuálne poznatky o enzýmoch, zúčastňujúcich sa tvorby benzylochinolínových alkaloidov. Do tejto skupiny alkaloidov patria napríklad morfín, kodeín, tebaín a sanguinarín, ktoré majú svoje nezastupiteľné miesto vo farmaceutickej praxi. Doteraz sa ich nedarí pripraviť synteticky s dostatočnou účinnosťou, a preto je štúdium enzymológie ich tvorby stále aktuálne. Zvláštna pozornosť sa v práci venuje poznatkom o jednotlivých enzýmoch na molekulárno-biologickej, resp. génovej úrovni. Práve tieto poznatky sú esenciálne pre prípadné zavedenie molekulárno-biologických prístupov do šľachtenia rastlín, produkujúcich terapeuticky zaujímavé benzylochinolínové alkaloidy.

**K l ú č o v é s l o v á:** benzylochinolínové alkaloidy – morfinany – benzofenantridíny – *Papaver somniferum* L. – *Eschscholtzia californica* Cham.

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 17–22

### SUMMARY

#### Enzymology of Production of Benzyloquinoline Alkaloids

This review paper summarizes the current knowledge of enzymes participating in the production of benzyloquinoline alkaloids. This group of alkaloids comprises, e.g., morphine, codeine, thebaine, and sanguinarine, which have an irreplaceable position in pharmaceutical practice. For the time being, chemists have not managed to prepare them synthetically with sufficient efficacy, and therefore the study of the enzymology of their formation remains a topical problem. The paper pays particular attention to the knowledge of individual enzymes on the molecular, or gene level. This very knowledge is essential for possible introduction of molecular-genetic approaches to the cultivation of plants producing therapeutically interesting benzyloquinoline alkaloids.

**K e y w o r d s:** benzyloquinoline alkaloids – morphinans – benzophenanthridines – *Papaver somniferum* L. – *Eschscholtzia californica* Cham.

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 17–22

Má

Benzylochinolínové (BICH) alkaloidy sú širokou skupinou alkaloidov, ktoré sú tvorené rastlinami čeľadi *Berberidaceae*, *Fumariaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae* a *Ranunculaceae*. Podľa charakteru uhlíkatého skeletu sa ďalej rozdeľujú na niekoľko podskupín – napr. morfinany, sekoftalidizochinolín, ftalydizochinolín, benzofenantridíny, protoberberíny, berberíny, protopíny. Z hľadiska enzymológie ich tvorby sú najlepšie preštudované morfinany, benzofenantridíny a berberíny. V týchto troch skupinách alkaloidov boli izolované a aspoň čiastočne charakterizované všetky enzýmy, ktoré sa zúčastňujú na ich biosyntéze.

Uhlíkový skelet benzylochinolínových alkaloidov

vzniká z dvoch molekúl tyrozínu, z ktorých sa tzv. pre-retikulínovou dráhou tvorí (*S*)-retikulín, ktorý je centrálnym medziproduktom všetkých BICH alkaloidov. Winterstein a Trier na základe štruktúr alkaloidov už v roku 1910 vyslovili názor, že alkaloidy sú biogeneticky príbuzné s aminokyselinami<sup>1)</sup>. Správnosť tejto teórie sa jednoznačne potvrdila značením aminokyselín izotopmi <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>, D, T, <sup>15</sup>N a sledovaním inkorporácie týchto rádioaktívnych prekurzorov do štruktúry alkaloidov. Podľa pôvodnej predstavy sa skelet benzylochinolínových alkaloidov tvorí Picketovou-Spenglerovou reakciou dopamínu s 3,4-dihydroxyfenylacetaldehydom. V súlade s vyslovenými teoretickými úvahami sa za prvý

intermediát v biosyntéze benzylozochinolíkových alkaloidov považoval (*S*)-norlaudanozolín. Ako sa však ukázalo neskôr, prvým medziproduktom s benzyl-izochinolínovou štruktúrou je norkoklaurín.

V snahe objasniť spôsob zabudovania sa oboch molekúl tyrozínu do skeletu morfinanov, infiltrovali sa do rastliny maku siateho rádionuklidmi značené predpokladané prekurzory. Zistilo sa, že tyrozín sa inkorporuje do oboch častí BICH skeletu, t. j. do benzylovej i izochinolínovej časti <sup>2</sup>). Molekuly dopamínu a 4-hydroxyfenylacetaldehydu (TYRAL), vzniknuté z tyrozínu, kondenzujú v prítomnosti norkoklaurínsyntázy za vzniku (*S*)-norkoklaurínu, prvého intermediátu s BICH štruktúrou <sup>3</sup>). Dopamín, aminokondenzačná jednotka, vzniká účinkom polyfenoloxidázy (PPO, EC 1.14.18.1) z tyramínu, ktorý vznikol dekarboxyláciou tyrozínu (TyrDC, EC 4.1.1.25). Pôvod karbonylkondenzačnej jednotky TYRALu nie je celkom objasnený. Môže sa tvoriť dekarboxyláciou z *p*-hydroxyfenylpyruvátu, vzniknutého transamináciou (TyrAT, EC 2.6.1.5) tyrozínu <sup>4</sup>), alebo aminooxidázovou aktivitou (AO, EC 1.4.3.6) z tyramínu, ktorý je produktom dekarboxylácie tyrozínu <sup>5</sup>).

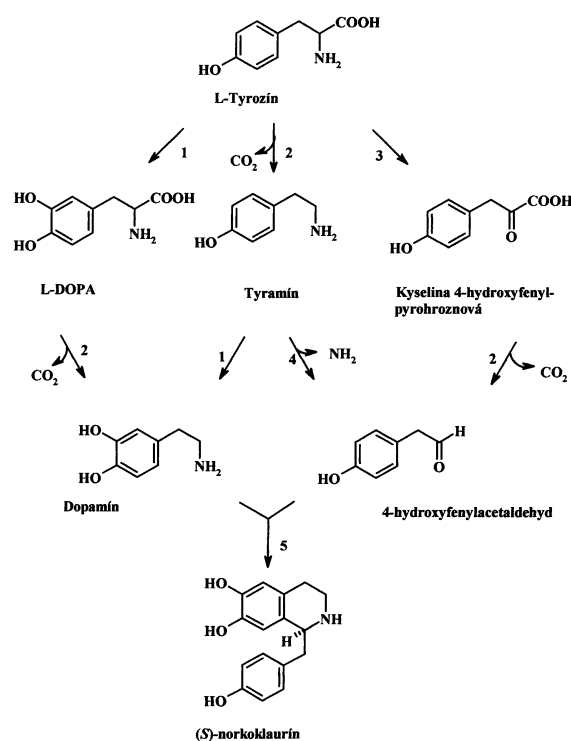
Dopamín a 4-hydroxyfenylacetaldehyd kondenzujú za účasti norkoklaurínsyntázy (EC 4.2.1.78) na trihydroxybenzylozochinolínový alkaloid (*S*)-norkoklaurín. Norkoklaurínsyntáza bola čiastočne purifikovaná z maku siateho v roku 2001 <sup>6</sup>) a bola použitá na štúdium kinetických vlastností. Samanani a Facchini <sup>7</sup>) sériou krokov iónovymennej chromatografie purifikovali do homogenity aj norkoklaurínsyntázu z *Thalictrum flavum* – enzým je dimérom, zloženým z dvoch 15 kDa podjednotiek a diskovou elektroforézou boli detegované jeho 4 nábojové formy. Obidve študované norkoklaurínsyntázy vykazujú pozitívnu kooperativitu medzi väzbovým miestom pre 4-hydroxyfenylacetaldehyd a väzbovým miestom pre dopamín. Enzým pracuje „izo-usporiadaným bi-uni“ mechanizmom. Najprv sa naviaže TYRAL a následne aj dopamín. Pre TYRAL vykazuje hyperbolicnú saturačnú kinetiku, ale pre dopamín sigmoidálnu kinetiku, z čoho sa dá predpokladať kooperativita medzi väzbovými miestami pre dopamín oboch podjednotiek. Enzýmy s takouto kinetikou katalyzujú regulačné, resp. rýchlosť limitujúce kroky metabolických dráh, preto sa predpokladá účasť norkoklaurínsyntázy v kontrole „prívodu“ prekurzorov do biosyntézy benzylozochinolínov <sup>7</sup>).

Súčasná predstava biosyntézy norkoklaurínu je znázornená na obrázku 1.

### Biosyntéza (*S*)-retikulínu a morfinanov

(*S*)-norkoklaurín je postupne premieňaný na (*S*)-retikulín za účasti 6-*O*-metyltransferázy, *N*-metyltransferázy, na cytochróme P-450 závislej hydroxylázy a 4'-*O*-metyltransferázy cez medziprodukty (*S*)-koklaurín, (*S*)-*N*-metylkoklaurín a 3'-hydroxy-*N*-metyl-(*S*)-koklaurín.

Dostupné poznatky o 6-*O*-metyltransferáze (EC 2.1.1.128) pochádzajú z *Coptis japonica* <sup>8</sup>) a *Thalictrum tuberosum* <sup>9</sup>). 6-*O*-metyltransferáza z *Coptis* má relatívnu molekulovú hmotnosť (Mr) 95 kDa a je zložená

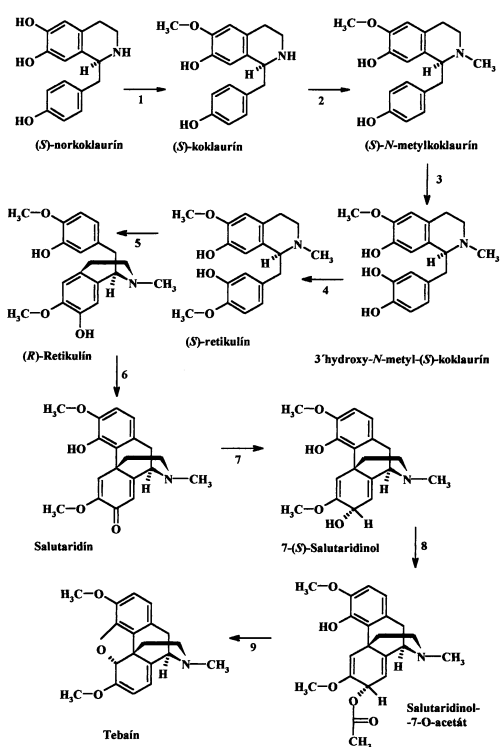


Obr. 1. Biosyntéza (*S*)-norkoklaurínu. 1) polyfenoloxidáza, 2) tyrozín/DOPAdekarboxyláza, 3) transamináza, 4) aminooxidáza, 5) norkoklaurínsyntáza

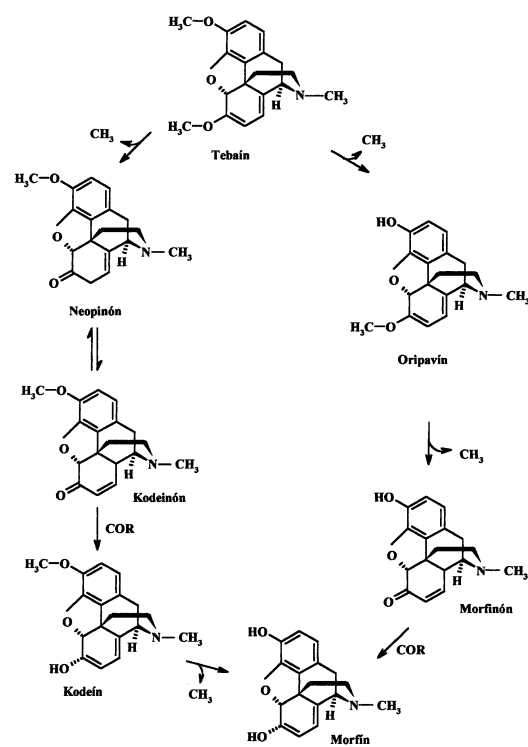
z dvoch podjednotiek s Mr 40 kDa. Má širokú substrátovú špecifitu, metyluje (*S*)-norkoklaurín, (*R*)-norkoklaurín a (*R,S*)-norlaudanozolín. U *Thalictrum* boli v cDNA knižnici identifikované 4 rôzne cDNA, kódujúce 6-*O*-metyltransferázu. Ich podobnosť na úrovni aminokyselín sa pohybovala od 93 do 99 %, ale 3'- a 5'- neprekladané sekvencie sú unikátne. Predpokladá sa, že podjednotky dimerizujú, a tak môžu vzniknúť 4 typy homo- a 6 typov heterodimérov. Priamy dôkaz o existencii dimérov *in vivo* zatiaľ chýba. Všetky diméry sa v *in vitro* experimentoch vyznačovali širokou, ale navzájom sa odlišujúcou substrátovou špecifitou, zahŕňajúcou jednoduché catecholy, fenylopropanoidy a benzylozochinolíny. (*S*)-norkoklaurín akceptujú iba diméry, obsahujúce aspoň jednu podjednotku OMT/1, (*S*)-norlaudanozolín akceptovali diméry, obsahujúce aspoň jednu podjednotku OMT/1 alebo OMT/2. Zaujímavé je, že hoci sa OMT/4 líši od OMT/1 len jednou aminokyselinou, homodimér zložený z OMT/4 podjednotiek neakceptuje ani (*S*)-norkoklaurín ani (*S*)-norlaudanozolín.

*N*-metyltransferáza (EC 2.1.1.140) bola izolovaná z *Berberis koetincana* <sup>10</sup>). Pomocou hydrofóbnej chromatografie boli identifikované 3 izofórm s označením NMT I, NMT II a NMT III. Izofórm NMT I a NMT III majú relatívnu molekulovú hmotnosť 60 kDa, NMT II 78 kDa. Všetky tri izofórm majú širokú substrátovú špecifitu.

Premenu (*S*)-*N*-metylkoklaurínu na 3'-hydroxy-*N*-metyl-(*S*)-koklaurín katalyzuje na cytochróme P-450 závislá hydroxyláza (EC 1.14.13.71), ktorá bola najprv identifikovaná v *Eschscholtzia californica* <sup>11</sup>). Pri jej štú-



Obr. 2. Biosyntéza tebaínu z (S)-norkoklaurínu. 1) (S)-norkoklaurín-6-O-metyltransferáza, 2) koklaurín-N-metyltransferáza, 3) (S)-N-metylkoklaurín-3'-hydroxyláza, 4) 3'-hydroxy-N-metyl-(S)-koklaurín-4'-O-metyltransferáza, 5) 1,2-dehydroretikulínreduktáza, 6) salutaridínsyntáza, 7) salutaridín-7-oxidoreduktáza, 8) salutaridinol-7-O-acetyltransferáza, 9) spontánne pri pH 8,0 až 9,0.



Obr. 3. Biosyntetické dráhy tvorby morfinu z tebaínu. Zúčastnené enzýmy: COR – kodeinónreduktáza, demetylázy – zatiaľ neidentifikované

diu sa vychádzalo z podobnosti rastlinných na cytochróm P-450 závislých hydroxyláz. Pomocou PCR bol pripravený 130 bp dlhý fragment, ktorý bol použitý ako sonda pri hľadaní v cDNA knižnici zo suspenznej kultúry *Eschscholtzia californica*. Enzymologické vlastnosti enzýmu boli študované po heterológnej expresii v bunkách *Spodoptera frugiperda*. Následne bola detegovaná aj v maku siatom <sup>12)</sup>. Uvedená hydroxyláza je vysoko špecifická pre (S)-N-metylkoklaurín.

Podobne ako N-metyltransferáza, aj 4'-O-metyltransferáza (EC 2.1.1. 116) bola izolovaná z *Berberis koetianeana* <sup>13)</sup>. Enzým má Mr 40 kDa a na rozdiel od predošlých metyltransferáz má užšiu substrátovú špecifitu. Navyše je prísne S-stereoselektívny – akceptuje (S)-koklaurín, ale nie (R)-koklaurín, a 4'-OH regiošpecifický. Je kľúčovým enzýmom, ktorý umožňuje len (S)-enantiómom vstupovať do ďalších krokov biosyntézy. Morishige et al. <sup>14)</sup> osekvenovali gén pre 4'-O-metyltransferázu z *Coptis japonica* a získanú sekvenciu porovnali so sekvenciami 6-O-metyltransferázy z *Thalictrum tuberosum* <sup>9)</sup>. Zistili 35% identitu na úrovni aminokyselín. Okrem odlišnosti v sekvencii a substrátovej špecifite sa tieto dva enzýmy líšia aj mechanizmom reakcie – 6-O-metyltransferáza katalyzuje reakcie mechanizmom „ping-pong bi bi“ <sup>8)</sup>, kým 4'-O-metyltransferáza „usporiadaným bi-bi“ mechanizmom <sup>14)</sup>.

(S)-retikulín je kľúčovým intermediátom v biosyntéze všetkých benzylozochinolinových alkaloidov. Výskyt dvoch izomérov (R) a (S) podmieňuje tvorbu rôznych

typov BICH alkaloidov. Z (R)-retikulínu sú odvodené morfinany, z (S)-retikulínu vychádzajú biosyntetické dráhy, vedúce k benzofenantridínom (sanguinarín, makarpín), ale aj k protoberberínom a berberínom (berberín, palmitín – u *Berberidaceae* a *Ranunculaceae*) <sup>15)</sup>.

Premena (S)-retikulínu na (R)-retikulín prebieha cez 1,2-dehydroretikulín za účasti na NADPH závislej 1,2-dehydroretikulín reduktázy (EC 1.5.1.27). Tento enzým bol purifikovaný do homogenity iónovýmennou chromatografiou zo 4-dňových klíčkov maku sateho a má relatívnu molekulovú hmotnosť 30 kDa. Premena prebieha cez 1,2-dehydroretikulín, pričom je preň enzým vysoko špecifický – neakceptuje ani 1,2-dehydronorretikulín ani 1,2-dehydrokoklaurín. Dehydroretikulínreduktáza bola detegovaná len v klíčkoch *Papaver somniferum* a *Papaver bracteatum*, nie u *Papaver persicum* ani u *Papaver orcopilum*, samozrejme ani u zástupcov čeľadi *Papaveraceae*, *Berberidaceae* a *Ranunculaceae*, ktoré neprodukujú morfinany. Takisto nebola detegovaná v *in vitro* kultúrach maku sateho <sup>16)</sup>.

Kritickou reakciou v tvorbe morfinanov je vnútro-molekulová sekundárna cyklizácia pri premene (R)-retikulínu na salutaridín. Jedná sa o vznik väzby medzi C-12 a C-13 tzv. „fenolickým spojením“, čím sa tricyklický retikulín transformuje na tetracyklickú bázu. Napriek úsiliu organických chemikov sa nedarí uskutočniť túto reakciu synteticky s dostatočnou účinnosťou, a preto je farmaceutický priemysel odkázaný na produkciu morfinanov makom siatym. Reakciu katalyzuje membránovo

viazaná na cytochróme P-450 závislá salutaridín-syntéza<sup>17)</sup>. Salutaridínsyntáza (EC 1.14.21.4) je vysoko špecifická pre (*R*)-retikulín, neakceptuje (*R*)-norretikulín, (*R*)-koklaurín, ani (*S*)-retikulín.

Zo salutaridínu za účasti salutaridín:NADPH-7-oxido-reduktázy (EC 1.1.1.248) redukciov vzniká zmes epimérnych alkoholov (*7S*)-salutaridinolu a 7-epi-salutaridinolu. Biologicky aktívny je iba salutaridinol v (*7S*)-konfigurácii, 7-epimér sa na tebaín netransformuje. Salutaridín-oxido-reduktáza bola z 15 študovaných druhov rodu *Papaver* nájdená iba u *Papaver somniferum* a *Papaver bracteatum*. Mr salutaridín-oxido-reduktázy je 51 kDa<sup>18)</sup>.

Salutaridinol-7-*O*-acetyltransferáza (EC 2.3.1.150) katalyzuje prenos acetylu z acetyl-koenzýmu A na 7-OH skupinu salutaridinolu, čím vzniká salutaridinolacetát. Enzým bol purifikovaný z kultúr *Papaver bracteatum* a *Papaver somniferum*. Je to monomérny proteín a má relatívnu molekulovú hmotnosť 51 kDa<sup>19)</sup>.

V slabo zásaditom prostredí sa salutaridinolacetát spontánne premieňa vytvorením väzby medzi C-4 a C-5 cez kyslíkový mostík na tebaín, ktorý je prvým morfinanovým alkaloidom s kompletnou pentacyklickou štruktúrou. Časť biosynthetickej dráhy od norkoklaurínu po tebaín je na obrázku 2.

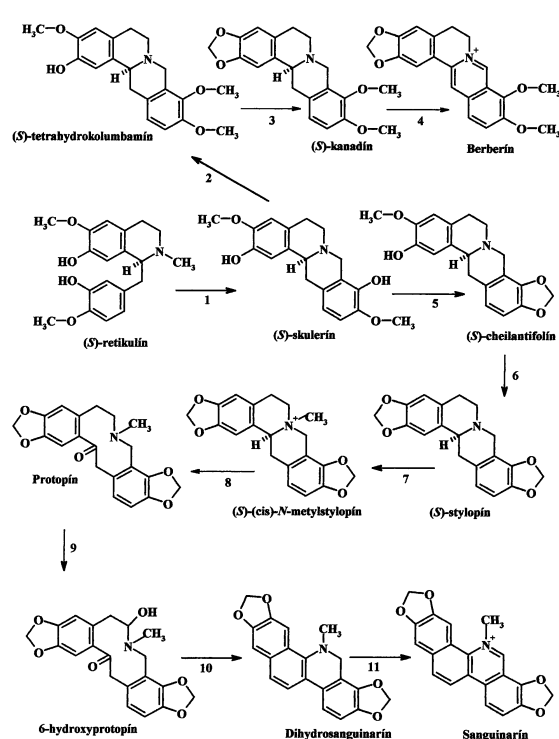
Z tebaínu sa cez kodeinón tvorí kodeín a následne morfín (obr. 3). Prvým krokom je demetylácia tebaínu na neopinón, resp. kodeinón, ktorí sú v ekvilíbriu. Kodeinón je za účasti kodeinón-reduktázy (EC 1.1.1.247) premieňaný na kodeín. Kodeinón-reduktáza, izolovaná z maku siateho, je monomérny enzým s relatívnu molekulovou hmotnosťou 35 kDa<sup>20)</sup>. Z kodeínu vzniká morfín demetyláciou.

Alternatívne môže byť tebaín dvakrát demetylovaný cez oripavín na morfinón. Za demetylačné kroky, nachádzajúce sa medzi tebaínom a morfinóm, sú pravdepodobne zodpovedné na cytochróme P-450-závislé enzýmy<sup>21)</sup>. Morfinón je redukovaný na morfín za účasti kodeinón-reduktázy. Tá akceptuje ako substrát aj kodeinón aj morfinón<sup>20)</sup>.

### Biosyntéza benzofenantridínových a berberínových alkaloidov

Benzofenantridínové alkaloidy vznikajú priamo z (*S*)-retikulínu, ktorý je za účasti berberín premostujúceho enzýmu (oficiálny názov retikulínoxidáza, EC 1.21.3.3) premieňaný na (*S*)-skulerín. Vznik „metylénového mostíka“ sa zatiaľ nepodarilo uskutočniť syntetickými chemickými metódami. Berberín premostujúci enzým bol prvýkrát purifikovaný a charakterizovaný u *Berberis beaniana*<sup>22)</sup>, neskôr aj u *Eschscholtzia californica*<sup>23)</sup> a maku siateho<sup>24)</sup>.

Účinkom cheilantifolínsyntázy (EC 1.14.21.2) sa 10-metoxi skupina na D-kruhu (*S*)-skulerínu premieňa na metyléndioxidový most, čím vzniká (*S*)-cheilantifolín. Uzatvorením druhého metyléndioxidového mosta na A-kruhu (*S*)-cheilantifolínu za účasti stylopínsyntázy (EC 1.14.21.1) vzniká (*S*)-stylopín. Cheilantifolínsyntáza a stylopínsyntáza sú vysoko špecifické oxidázy, závislé na cytochróme P-450<sup>25)</sup>. Metyláciou (*S*)-stylopínu



Obr. 4. Biosyntéza berberínu a sanguinarínu z (*S*)-retikulínu. 1) berberín premostujúci enzým, 2) skulerín-9-*O*-metyltransferáza, 3) kanadínsyntáza, 4) kanadín-oxidáza, 5) cheilantifolínsyntáza, 6) stylopínsyntáza, 7) stylopín-*N*-metyltransferáza, 8) *N*-metylstylopínhydroxyláza, 9) protopínhydroxyláza, 10) spontánne, 11) dihydrobenzofenantridín-oxidáza

vzniká (*S*)-cis-*N*-metylstylopín. Reakciu katalyzuje (*S*)-tetrahydroprotoberberín-cis-*N*-metyltransferáza (EC 2.1.1.122). Tento 39 kDa proteín bol purifikovaný zo *Sanguinaria canadensis*<sup>26)</sup>. Za nasledujúce dva kroky sú zase zodpovedné oxidázy, závislé na cytochróme P-450. Najprv (*S*)-cis-*N*-metylstylopínhydroxyláza (EC 1.14.13.37) katalyzuje hydroxyláciu na C-14 za vzniku protopínu<sup>27)</sup>. Potom protopín-6-hydroxyláza (EC 1.14.13.55) katalyzuje hydroxyláciu na C-6 protopínu na 6-hydroxyprotopín<sup>28)</sup>. 6-hydroxyprotopín sa spontánne premieňa na dihydrosanguinarín, ktorý už má benzofenantridínovú štruktúru. Sanguinarín vzniká oxidáciou dihydrosanguinarínu. Za túto oxidáciu je zodpovedná dihydrobenzofenantridín-oxidáza (EC 1.5.3.12), ktorá vo svojej molekule obsahuje ako kofaktor meď a pre svoju aktivitu vyžaduje O<sub>2</sub><sup>4)</sup>.

Z *Thalictrum bulgaricum* boli izolované ďalšie dva enzýmy, dihydrochelirubín-12-hydroxyláza (EC 1.14.13.57) a 12-hydroxychelirubín-12-*O*-metyltransferáza (EC 2.1.1.120)<sup>29)</sup>, ktoré katalyzujú posledné dva kroky v biosyntéze makarpínu. Makarpín je najoxidovanejší benzylzochinolinový alkaloid v prírode.

U rastlín čeľadi *Berberidaceae* a *Ranunculaceae* je skulerín metylovaný účinkom na *S*-adenozylmetioníne závislej 9-*O*-metyltransferázy (EC 2.1.1.117) na (*S*)-tetrahydrokolumbarín<sup>30)</sup>, ktorý je ďalej premieňaný kanadínsyntázou (EC 1.5.1.31) na (*S*)-kanadín<sup>31)</sup>. Následne účinkom kanadín-oxidázy vzniká berberín<sup>15)</sup>. Biosyntéza sanguinarínu a berberínu je uvedená na obrázku 4.



### Charakterizácia enzýmov, zúčastňujúcich sa na tvorbe benzylozochinolínov z hľadiska molekulárnej biológie

Z molekulárno-biologického hľadiska je z enzýmov, zúčastňujúcich sa na tvorbe BICH alkaloidov najlepšie preštudovaná tyrozín/DOPA dekarboxyláza (TYDC). Táto dekarboxyláza patrí do skupiny od pyridoxal-5'-fosfátu závislých dekarboxyláz aminokyselín. Na základe podobnosti aminokyselinových sekvencií sa skupina rozdeľuje do štyroch podskupín. Do prvej podskupiny sa zaraďujú dekarboxylázy glycínu, do druhej dekarboxylázy glutamátu, histidínu, tyrozínu a tryptofánu, do tretej prokaryotické formy dekarboxyláz lyzínu, ornitínu a arginínu a do štvrtej eukaryotické dekarboxylázy ornitínu a lyzínu. Tieto štyri skupiny nevykazujú navzájom evolučnú príbuznosť. V rámci druhej podskupiny, v ktorej sa nachádzajú dekarboxylázy, zapojené do tvorby alkaloidov, je pravdepodobné, že tieto dekarboxylázy majú spoločný evolučný pôvod v jednom géne. Pri porovnaní aminokyselinových sekvencií dekarboxyláz, roztriedených podľa substrátovej špecifity pre jednotlivé aminokyseliny (Gln, His, Tyr, Trp), sa vzájomná podobnosť pohybuje medzi 50 až 68 %<sup>32</sup>.

TYDC je intenzívne študovaná v maku siatom. Najprv boli podľa sekvencií dvoch vysoko konzervovaných domén, nájdených u dekarboxyláz aromatických aminokyselín rôznych organizmov (Tryptofán-DC *Catharanthus roseus*, DOPA-DC *Drozophila melanogaster*, DOPA-DC človek) pripravené PCR primery. Tieto boli použité na prípravu DNA sondy pre skríning cDNA knižnice zo 7-dňových klíčkov maku. Takto bol nájdený klon cTYDC 1 s neúplným čítacím rámcom. Zároveň sa ako sonda použil inzert z cDNA knižnice *Catharanthus roseus* pre tryptofán DC. Pomocou neho sa našli klony cTYDC 2 a cTYDC 3. Homológia medzi cTYDC 2 a cTYDC 3 bola 90 %, ale medzi cTYDC 1 a cTYDC 2 iba 75 %. Preto bol cTYDC 1 použitý ako sonda v genómovej knižnici maku – boli vybrané dva klony, prvý identický s cTYDC 1 na 100 %, druhý na 90 % (dostal označenie gTYDC 4). Na základe podobnosti boli klony rozdelené do dvoch podskupín:

- 1) cTYDC 1 a gTYDC 4,
- 2) cTYDC 2 a cTYDC 3.

Ako reprezentanti jednotlivých podskupín boli vybrané klony cTYDC 1 a cTYDC 2 a použité na skríning genómovej DNA maku, nastrihanej štyrmi restriktívnymi endonukleázami. S cTYDC 1 bolo získaných 6–8 pozitívnych pásov, s cTYDC 2 4–6 pozitívnych pásov. Z toho je možné usudzovať, že Tyr/ DOPA DC je v maku kódovaná spoločnosťou 10–14 génov<sup>33</sup>.

Na štúdium pletivovo-špecifickej expresie TYDC génovej rodiny boli použité *in situ* RNA hybridizačné techniky s próbami cTYDC 1 a cTYDC 2. Ukázalo sa, že TYDC expresia je obmedzená na vaskulárne pletivá v stonke a v koreňoch. TYDC 1 gény sú preferenčne exprimované v koreňoch, kým v stonke a ostatných vzdušných orgánoch predovšetkým TYDC 2 gény. Expresia vo vaskulárnych pletivách podporuje úlohu vaskulárnych pletív ako primárneho miesta biosyntézy izochinolínových alkaloidov. Rozvíjajúci sa piestik nemá TYDC transkripty. Táto skutočnosť v súvislosti

s nízkou aktivitou salutaridínsyntázy umožňuje predpokladať, že alkaloidy sú syntetizované v stonke a potom sú translokované do makovice.

TYDC 1 gény sú exprimované predovšetkým vo floéme v koreňoch, kde sú hlavnými alkaloidmi sanguinarín a morfín. Neprítomnosť TYDC 1 a sanguinarínu v latexe (resp. v nadzemnej časti) predpokladá, že expresia TYDC 1 génov je koordinovane regulovaná s inými génmi, špecificky zahrnutými do biosyntézy benzofenantridínových alkaloidov. Hojnosť morfínu v latexe a jeho prítomnosť v extrakte z koreňa súčasne s TYDC 2 transkriptami predpokladá možnú asociáciu medzi reguláciou expresie TYDC 2 a inými špecifickými génmi biosyntézy morfínanových alkaloidov<sup>34</sup>.

V roku 1996 Maldonado-Mendoza et al.<sup>35</sup> identifikovali ďalšieho člena TYDC génovej rodiny a označili ho TYDC 5. Na úrovni aminokyselín sa podobá na TYDC 1 na 86 %, na TYDC 2 75 %. Je preferenčne exprimovaný v koreňoch a klíčiach semenách. Od TYDC 1 a TYDC 2 sa TYDC 5 odlišuje aj substrátovou špecifitou. Kým TYDC 1 a TYDC 2 uprednostňujú dihydroxyfenylalanín (DOPA) pred tyrozínom, TYDC 5 naopak uprednostňuje Tyr pred DOPA.

V roku 1998 k známym TYDC génom pribudli nové gény: TYDC 6, TYDC 7, TYDC 8 a TYDC 9<sup>36</sup>. Napriek intenzívnemu štúdiu nemôže byť TYDC použitá ako priamy marker pri štúdiu biosyntézy alkaloidov, pretože TYDC je zapojená aj do iných biochemických procesov, napr. do tvorby kyseliny hydroxyškoricovej<sup>37, 38</sup>.

Enzým (*S*)-*N*-metylkoklaurín-3'-hydroxyláza bola najprv preštudovaná v *Eschscholtzia californica*<sup>11</sup>. Pomocou DNA blot-analýzy boli v maku identifikované dva gény pre metylkoklaurínhydroxylázu. Analýza na úrovni RNA v elicitovaných suspenzných kultúrach ukázala, že hladiny transkriptu sa rapídne zvyšujú už po šiestich hodinách od elicitácie. Znamená to teda, že metylkoklaurínhydroxyláza je indukovateľný enzým<sup>12</sup>.

Prvým enzýmom, špecifickým pre biosyntézu morfínanov, študovaným na úrovni nukleových kyselín, bola kodeinónreduktáza (COR). Na základe mikrosekvenovania, PCR, reverznej PCR a blotov na genomickej DNA autori predpokladajú existenciu COR génovej rodiny s najmenej desiatimi členmi, pričom na úrovni RNA bolo zatiaľ zistených šesť alií, ktoré sa exprimujú v rastline a bunkových kultúrach maku<sup>21</sup>. Následne autori Huang a Kutchanová<sup>12</sup> zistili, že kodeinónreduktáza je konštitutívnym enzýmom (gén neodpovedá na elicitáciu zvýšením množstva cor-mRNA) a nie je teda ani limitujúcim faktorom, ovplyvňujúcim konečné množstvo alkaloidov v ópiu.

Druhým špecifickým enzýmom pre syntézu morfínanov, študovaným na génovej úrovni, je salutaridinol-7-O-acetyltransferáza (SalAT). Mikrosekvenovaním vyzolovaného enzýmu a následnou RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) autori zistili sekvenciu cDNA. Otvorený čítací rámec je dlhý 1425 nukleotidov (474 AK). SalAT-cDNA neobsahuje žiadny signálny peptid, čo potvrdzuje asociáciu SalAT s cytosolovou frakciou latexu. Na základe Southernovej hybridizácie sa predpokladá len jedna kópia SalAT v genóme maku siateho, pričom autori nevyklúčujú existenciu 2 veľmi podobných alií<sup>39</sup>.

Z biosyntetickej vetvy, vedúcej k sanguinarínu, bol na génovej úrovni študovaný berberín premostujúci enzým (BBE = berberine bridge enzyme). Facchini et al.<sup>24)</sup> identifikovali v genómovej knižnici maku siateho pomocou BBE cDNA z *Eschscholtzia californica* tri BBE klony. Ukázalo sa, že BBE 2 a BBE 3 sú pseudogény. Pozitívnu reakciu v Northernovej analýze poskytuje iba bbe 1, a to aj vo vzorkách z koreňa aj zo stonky (sanguinarín sa ale nachádza iba v koreni). K rapidnej akumulácii BBE mRNA dochádza v pletivových kultúrach po pôsobení fungálneho elicitora.

Enzým BBE je aktívny iba vo vakuolách, akumulujúcich sanguinarín. Na N-konci má 50 AK dlhú sekvenciu, ktorá je zodpovedná za jeho translokáciu najprv do špecifickej subdomény endoplazmatického retikula a následne do vakuol, akumulujúcich sanguinarín. Táto doména nevykazuje žiadnu sekvenčnú homológiu ani štrukturálnu podobnosť s inými rastlinnými signálnymi peptidmi, resp. determinantami pre vstup do vakuol. Pre smerovanie do endoplazmatického retikula je nepostrádateľných prvých 25 AK, pre lokalizáciu vo vakuolách je esenciálny úsek medzi aminokyselinami 26 až 41<sup>40)</sup>.

Štúdium enzymológie tvorby BICH alkaloidov a predovšetkým morfinanov je stále aktuálne, pretože doteraz je farmaceutický priemysel odkázaný na ich produkciu rastlinami. Napriek úsiliu organických chemikov sa ich nedarí pripraviť synteticky s dostatočnou efektívnosťou. Detailné poznanie jednotlivých enzýmov na génovej úrovni je príslubom pre prípadné ciele zásahy do ich exprese v zmysle zvýšenia produkcie terapeuticky významných alkaloidov.

## LITERATÚRA

1. Winterstein, E., Trier, G.: Die Alkaloide. Berlin, Gebrüder Bornträger, 1910, 307. In: Stadler, R., Kutchan, T. M., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1989; 28, 1083-1086.
2. Rueffer, M., Zenk, M. H.: Zeitschrift für Naturforschung, 1987; 42, 319-332.
3. Stadler, R., Kutchan, T. M., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1989; 28, 1083-1086.
4. Kutchan, T. M.: In: The alkaloids: Chemistry and Biology. (Cordell, A. G., ed.), San Diego, Academic Press, 1998, 258-311.
5. Bilková, A., Bezáková, L., Bilka, F., Pšenák, M.: Čes. slov. Farm., 2000; 49, 171-176.
6. Samanani, N., Facchini, P. J.: Planta, 2001; 213, 898-906.
7. Samanani, N., Facchini, P. J.: J. Biol. Chem., 2002; 277, 33878-33883.
8. Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y. et al.: Eur. J. Biochem., 1994; 225, 125-131.

9. Frick, S., Kutchan, T. M.: Plant J., 1999; 17, 329-339.
10. Frenzel, T., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1990; 29, 3491-3497.
11. Pauli, H. H., Kutchan, T. M.: Plant J., 1998; 13, 793-801.
12. Huang, F., Kutchan, T. M.: Phytochemistry, 2000; 53, 555-564.
13. Frenzel, T., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1990; 29, 3505-3511.
14. Morishige, T., Tsujita, T., Yamada, Y., Sato, F.: J. Biol. Chem., 2000; 275, 23398-23405.
15. Hashimoto, T., Yamada, Y.: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1994; 45, 257-285.
16. De-Eknamkul, W., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1992; 31, 313-321.
17. Gerardy, R., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1993; 32, 79-86.
18. Gerardy, R., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1993; 34, 125-132.
19. Lenz, R., Zenk, M. H.: J. Biol. Chem., 1995; 270, 31091-31096.
20. Lenz, R., Zenk, M. H.: Eur. J. Biochem., 1995; 233, 132-139.
21. Unterlinner, B., Lenz, R., Kutchan, T. M.: Plant J., 1999; 18, 465-475.
22. Steffens, P., Nagakura, N., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1985; 24, 2577-2583.
23. Dittrich, H., Kutchan, T. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991; 88, 9969-9973.
24. Facchini, P. J., Penzes, C., Johnson, A. G., Bull, D.: Plant Physiol., 1996; 112, 1669-1677.
25. Bauer, W., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1991; 30, 2953-2961.
26. O'Keefe, B. R., Beecher, C. W. W.: Plant Physiol., 1994; 105, 395-403.
27. Rueffer, M., Zenk, M. H.: Tetrahedron Lett., 1987; 28, 5307-5310.
28. Tanahashi, T., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1990; 29, 1113-1122.
29. Kammerer, L., De-Eknamkul, W., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1994; 36, 1409-1416.
30. Sato, F., Takeshita, N., Fitchen, J. H. et al.: Phytochemistry, 1993; 32, 659-664.
31. Rueffer, M., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1994; 36, 1219-1223.
32. Facchini, P. J., Huber-Allanach, K. L., Tari, L. W.: Phytochemistry, 2000; 54, 121-138.
33. Facchini, P. J., De Luca, V.: J. Biol. Chem., 1994; 269, 26684-26690.
34. Facchini, P. J., De Luca, V.: Plant Cell, 1995; 7, 1811-1821.
35. Maldonado-Mendoza, I. E., Lopez-Meyer, M., Galef, J. R. et al.: Plant. Physiol., 1996; 110, 43-49.
36. Facchini, P. J., Penzes-Yost, C., Samanani, N., Kowalchuk, B.: Plant Physiol., 1998; 118, 69-81.
37. Facchini, P. J.: Phytochemistry, 1998; 49, 481-490.
38. Stano, J., Nemeč, P., Weissová, K. et al.: Phytochemistry, 1995; 38, 859-860.
39. Grothe, T., Lenz, R., Kutchan, T. M.: J. Biol. Chem., 2001; 33, 30717-30723.
40. Bird, D. A., Facchini, P. J.: Planta, 2001; 213, 888-897.

Došlo 12. 2. 2004.

Přijato ke zveřejnění 15. 4. 2004.

Mgr. Andrea Bilková  
Kalinčiaková 8, 832 32 Bratislava, SR  
e-mail: bilkova@fpharm.uniba.sk

## Omluva

V práci autorů Stankovičová M., Stráska L., Bezáková Ž., Renčová M.: Adsorpcia látok na aktívne uhlie 1. časť: Bázické estery kyseliny fenylkarbámovej s lokálnoanestetickým účinkom (Čes. slov. Farm., 2004; 53, 304-309) byl v tabulce 1 na straně 306 uveden nesprávný vzorec. Uvádíme správný vzorec a autorům článku se omlouváme.

(heg)

