

ENZYMOLOGIA TVORBY BENZYLIZOCHINOLÍ- NOVÝCH ALKALOIDOV

BILKOVÁ A., BILKA F., BEZÁKOVÁ L.

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

SÚHRN

Enzymológia tvorby benzylizochinolínových alkaloidov

Prehľadná práca sumarizuje aktuálne poznatky o enzymoch, zúčastňujúcich sa tvorby benzylizochinolínových 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 enzymoch na molekulárno-biologickej, resp. génovej úrovni. Práve tieto poznatky sú esenčné pre prípadné zavedenie molekulárno-biologických prístupov do ťaženia rastlín, produkujúcich terapeuticky zaujímavé benzylizochinolínové alkaloidy.

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

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 17–22

SUMMARY

Enzymology of Production of Benzylisoquinoline Alkaloids

This review paper summarizes the current knowledge of enzymes participating in the production of benzylisoquinoline 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 benzylisoquinoline alkaloids.

Key words: benzylisoquinoline alkaloids – morphinans – benzophenanthridines – *Papaver somniferum* L. – *Eschscholtzia californica* Cham.

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 17–22

Má

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

Uhlíkový skelet benzylizochinolínových 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 aminokyselinami¹⁾. Správnosť tejto teórie sa jednoznačne potvrdila značením aminokyselín izotopmi ¹³C, ¹⁴C, ¹⁴CH₃, D, T, ¹⁵N a sledovaním inkorporácie týchto rádioaktívnych prekurzorov do štruktúry alkaloidov. Podľa pôvodnej predstavy sa skelet benzylizochinolínových alkaloidov tvorí Picketovou-Spenglerovou reakciou dopamínu s 3,4-dihydroxyfenylacetalddehydom. V súlade s vyslovenými teoretickými úvahami sa za prvý

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

V snahe objasniť spôsob zabudovávania sa oboch molekúl tyrozínu do skeletu morfínanov, infiltrovali sa do rastliny maku siateho rádionuklidmi značené predpokladané prekurzory. Zistilo sa, že tyrozín sa inkorporuje do oboch častí BICH skeletu, t. j. do benzyllovej i izochinolínovej časti²⁾. Molekuly dopamínu a 4-hydroxyfenylacetalddehydu (TYRAL), vzniknuté z tyrozínu, kondenzujú v prítomnosti norkoklaurínsyntázy za vzniku (*S*)-norkoklaurínu, prvého intermediátu s BICH štruktúrou³⁾. 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) tyrozínu⁴⁾, alebo aminooxidázovou aktivitou (AO, EC 1.4.3.6) z tyramínu, ktorý je produkтом dekarboxylácie tyrozínu⁵⁾.

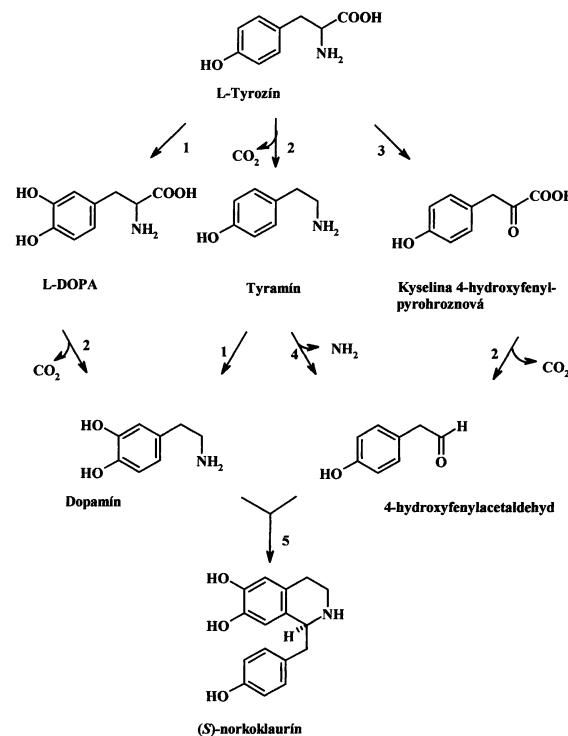
Dopamín a 4-hydroxyphenylacetalddehyd kondenzujú za účasti norkoklaurínsyntázy (EC 4.2.1.78) na trihydroxybenzylizochinolínový alkaloid (*S*)-norkoklaurín. Norkoklaurínsyntáza bola čiastočne purifikovaná z maku siateho v roku 2001⁶⁾ a bola použitá na štúdium kinetických vlastností. Samanani a Facchini⁷⁾ sériou krokov iónovýmennej 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-hydroxyphenylacetalddehyd a väzbovým miestom pre dopamín. Enzým pracuje „izo-usporiadaným bi-uni“ mechanizmom. Najprv sa naviaže TYRAL a následne aj dopamín. Pre TYRAL vykazuje hyperbolickú saturačnú kinetiku, ale pre dopamín sigmoidálnu kinetiku, z čoho sa dá predpokladať kooperativita medzi väzbovými miestami pre dopamín oboch podjednotiek. Enzýmy s takoto kinetikou katalyzujú regulačné, resp. rýchlosť limitujúce kroky metabolických dráh, preto sa predpokladá účasť norkoklaurínsyntázy v kontrole „prívodu“ prekurzorov do biosyntézy benzylizochinolínov⁷⁾.

Súčasná predstava biosyntézy norkoklaurínu je znázornená na obrázku 1.

Biosyntéza (*S*)-retikulínu a morfínanov

(*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*-methylkoklaurín a 3'-hydroxy-*N*-methyl-*(S)*-koklaurín.

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

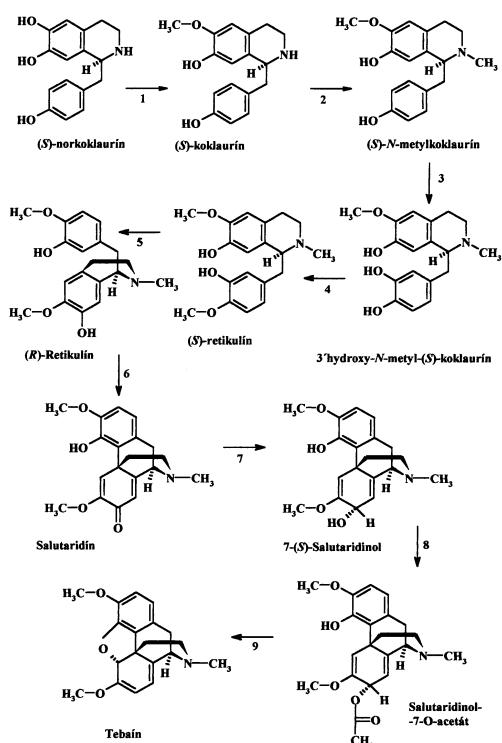


Obr. 1. Biosyntéza (*S*)-norkoklaurínu. 1) polyfenoloxidáza, 2) tyrozín/DOPAdekarboxyláza, 3) transamináza, 4) aminooxidáza, 5) norkoklaurínsyntáza

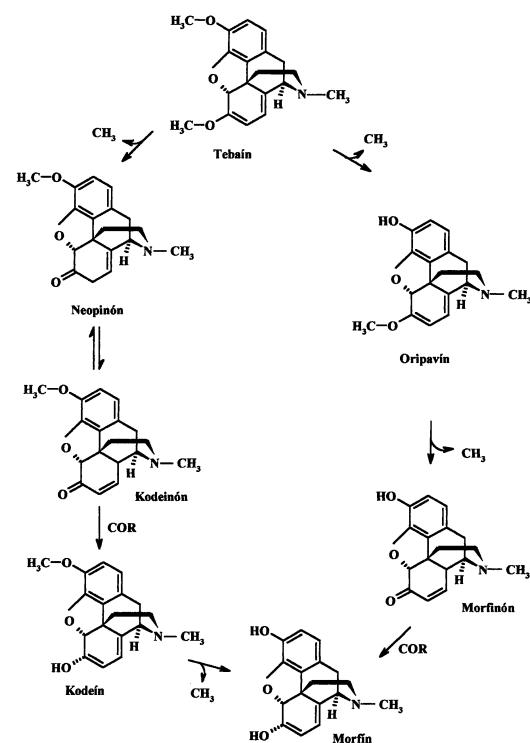
z dvoch podjednotiek s Mr 40 kDa. Má širokú substrátovú špecifitu, metyluje (*S*)-norkoklaurín, (*R*)-norkoklaurín a (*R,S*)-norlaudanozolín. U *Thalictrum* boli v cDNA knižnici identifikované 4 rôzne cDNA, kódujúce 6-*O*-metyltransferázu. Ich podobnosť na úrovni aminokyselín sa pohybovala od 93 do 99 %, ale 3' - a 5' - neprekladané sekvencie sú unikátné. Predpokladá sa, že podjednotky dimerizujú, a tak môžu vznikať 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 katecholy, fenylpropanoidy a benzylizochinolíny. (*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 líší 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 koetjaneana*¹⁰⁾. Pomocou hydrofóbnej chromatografie boli identifikované 3 izoformy s označením NMT I, NMT II a NMT III. Izoformy NMT I a NMT III majú relatívnu molekulovú hmotnosť 60 kDa, NMT II 78 kDa. Všetky tri izoformy majú širokú substrátovú špecifitu.

Premenu (*S*)-*N*-methylkoklaurínu na 3'-hydroxy-*N*-methyl-*(S)*-koklaurín katalyzuje na cytochróme P-450 závislá hydroxyláza (EC 1.14.13.71), ktorá bola najprv identifikovaná v *Eschscholtzia californica*¹¹⁾. 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-methyl-(S)-koklaurín-4'-O-metyltransferáza, 5) 1,2-dehydroretikulín-reduktáz, 6) salutaridínsyntáza, 7) salutaridín-7-oxidoreduktáz, 8) salutaridinol-7-O-acetyltransferáza, 9) spontánne premeny pri pH 8,0 až 9,0.



Obr. 3. Biosyntetické dráhy tvorby morfínu z tebaínu
Zúčastnené enzýmy: COR – kodeinónreduktáz, demetyláz – zatiaľ neidentifikované

diu sa vychádzalo z podobnosti rastlinných na cytochrom P-450 závislých hydroxyláz. Pomocou PCR bol prípravený 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 heterológej expresii v bunkách *Spodoptera frugiperda*. Následne bola detegovaná aj v maku siatom¹²⁾. 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 koetjneana*¹³⁾. Enzým má Mr 40 kDa a na rozdiel od predchádzajúcich 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)-enantiomerom vstupovať do ďalších krokov biosyntézy. Morishige et al.¹⁴⁾ osekvenovali gén pre 4'-O-metyltransferázu z *Coptis japonica* a získanú sekvenciu porovnali so sekvenciami 6-O-metyltransferázy z *Thalictrum tuberosum*⁹⁾. Zistili 35% identitu na úrovni aminokyselín. Okrem odlišnosti v sekvencii a substrátovej špecifite sú tieto dva enzýmy lišia aj mechanizmom reakcie – 6-O-metyltransferáza katalyzuje reakcie mechanizmom „ping-pong bi bi“⁸⁾, kym 4'-O-metyl-transferáza „usporiadaným bi-bi“ mechanizmom¹⁴⁾.

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

typov BICH alkaloidov. Z (R)-retikulínu sú odvodene morfínany, z (S)-retikulínu vychádzajú biosyntetické dráhy, vedúce k benzofenantridínom (sanguinarín, makarpín), ale aj k protoberberínom a berberínom (berberín, palmitín – u Berberidaceae a Ranunculaceae)¹⁵⁾.

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 siateho a má relatívnu molekulovú hmotnosť 30 kDa. Premena prebieha cez 1,2 – dehydroretikulín, pričom je pre enzým vysoko špecifický – neakceptuje ani 1,2-dehydroretikulín ani 1,2-dehydrokoklaurín. Dehydroretikulín reduktáza bola detegovaná len v klíčkoch *Papaver somniferum* a *Papaver bracteatum*, nie u *Papaver persicum* ani u *Papaver orcodophilum*, samozrejme ani u zástupcov čeľadí Papaveraceae, Berberidaceae a Ranunculaceae, ktoré neprodukujú morfínany. Takisto nebola detegovaná v *in vitro* kultúrach maku siateho¹⁶⁾.

Kritickou reakciou v tvorbe morfínanov je vnútromolekulová 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 morfínanov makom siatym. Reakciu katalyzuje membránovo

viazaná na cytochróme P-450 závislá salutaridínsyntáza¹⁷⁾. 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-oxidoreduktázy (EC 1.1.1.248) redukciou vzniká zmes epi-mérnych alkoholov (7S)-salutaridinolu a 7-epi-salutaridinolu. Biologicky aktívny je iba salutaridinol v (7S)-konfigurácii, 7-epimér sa na tebaín netransformuje. Salutaridínoxidoreduktáza bola z 15 študovaných druhov rodu *Papaver* nájdená iba u *Papaver somniferum* a *Papaver bracteatum*. Mr salutaridínoxidoreduktázy je 51 kDa¹⁸⁾.

Salutaridinol-7-O-acetyltransferáza (EC 2.3.1.150) katalyzuje prenos acetylku 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 kDa¹⁹⁾.

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

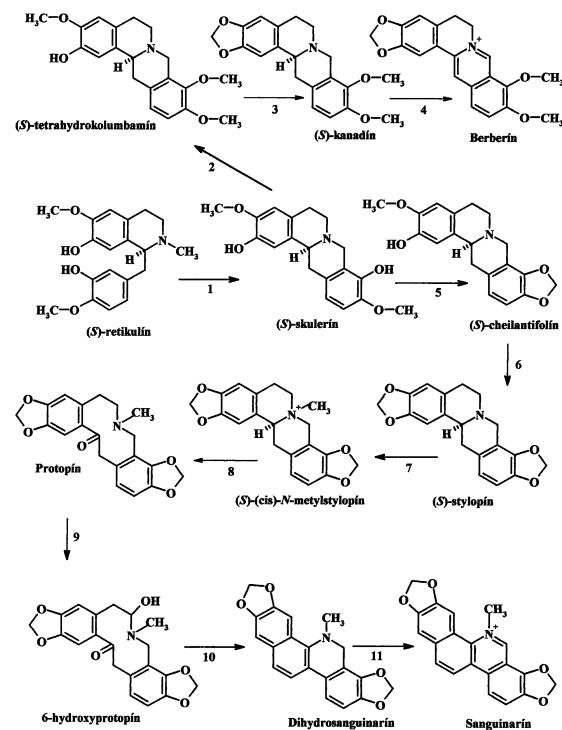
Z tebaínu sa cez kodeinón tvorí kodeín a následne morfín (obr. 3). Prvým krokom je demetylácia tebaínu na neopinón, resp. kodeinón, ktorí sú v ekvilibriu. Kodeinón je za účasti kodeinónreduktázy (EC 1.1.1.247) premieňaný na kodeín. Kodeinónreduktáza, izolovaná z maku siateho, je monomérny enzym s relatívnu molekulovou hmotnosťou 35 kDa²⁰⁾. Z kodeínu vzniká morfín demetyláciou.

Alternatívne môže byť tebaín dvakrát demetylovaný cez oripavín na morfinón. Za demetylačné kroky, nachádzajúce sa medzi tebaínom a morfinónom, sú pravdepodobne zodpovedné na cytochróme P-450-závislé enzymy²¹⁾. Morfinón je redukovaný na morfín za účasti kodeinónreduktázy. Tá akceptuje ako substrát aj kodeinón aj morfinón²⁰⁾.

Biosyntéza benzofenantridínových a berberínových alkaloidov

Benzofenantridínové alkaloidy vznikajú priamo z (S)-retikulínu, ktorý je za účasti berberín premostujúceho enzymu (oficiálny názov retikulínoxidáza, EC 1.21.3.3) premieňaný na (S)-skulerín. Vznik „metylénového mostíka“ sa zatiaľ nepodarilo uskutočniť syntetickými chemickými metódami. Berberín premostujúci enzym bol prvýkrát purifikovaný a charakterizovaný u *Berberis beaniana*²²⁾, neskôr aj u *Eschscholtzia californica*²³⁾ a maku siateho²⁴⁾.

Účinkom cheilantifolínsyntázy (EC 1.14.21.2) sa 10-metoxy skupina na D-kruhu (S)-skulerínu premieňa na metyléndioxidový most, čím vzniká (S)-cheilantifolin. Uzavorením 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-450²⁵⁾. Metyláciou (S)-stylopínu



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

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*²⁶⁾. Za nasledujúce dva kroky sú zase zodpovedné oxidázy, závislé na cytochróme P-450. Najprv (S)-cis-N-methylstylopínhydroxyláza (EC 1.14.13.37) katalyzuje hydroxyláciu na C-14 za vzniku protopínu²⁷⁾. Potom protopín-6-hydroxyláza (EC 1.14.13.55) katalyzuje hydroxyláciu na C-6 protopínu na 6-hydroxyprotopín²⁸⁾. 6-hydroxyprotopín sa spontánne premieňa na dihydrosanguinarín, ktorý už má benzofenantridínovú štruktúru. Sanguinarín vzniká oxidáciou dihydrosanguinarínu. Za túto oxidáciu je zodpovedná dihydrobenzofenantridínoxidáza (EC 1.5.3.12), ktorá vo svojej molekule obsahuje ako kofaktor med a pre svoju aktivitu vyžaduje O₂⁴⁾.

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)²⁹⁾, ktoré katalyzujú posledné dva kroky v biosyntéze makarpínu. Makarpín je najoxidovanejší benzylizochinolínový alkaloid v prírode.

U rastlín čeľadi *Berberidaceae* a *Ranunculaceae* je skulerín metylovaný účinkom na S-adenozylmethioníne závislej 9-O-metyltransferázy (EC 2.1.1.117) na (S)-tetrahydrokolumbarín³⁰⁾, ktorý je ďalej premieňaný kanadínsyntázou (EC 1.5.1.31) na (S)-kanadín³¹⁾. Následne účinkom kanadínoxidázy vzniká berberín¹⁵⁾. Biosyntéza sanguinarínu a berberínu je uvedená na obrázku 4.

Charakterizácia enzýmov, zúčastňujúcich sa na tvorbe benzylizochinolínov 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, rozdelených podľa substrátovej špecifity pre jednotlivé aminokyseliny (Gln, His, Tyr, Trp), sa vzájomná podobnosť pohybuje medzi 50 až 68 %³².

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 *Drosophila melanogaster*, DOPA-DC človek) pripravené PCR primery. Tieto boli použité na prípravu DNA sondy pre skrining cDNA knižnice zo 7-dňových klíčkov maku. Takto bol nájdený klon cTYDC 1 s neúplným čítacím rámcem. 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 skrining genómovej DNA maku, nastrihané štyrmi restrikčnými endonukleázami. S cTYDC 1 bolo získaných 6–8 pozitívnych pássov, s cTYDC 2 4–6 pozitívnych pássov. Z toho je možné usudzovať, že Tyr/ DOPA DC je v maku kódovaná spoločenstvom 10–14 génov³³.

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. Expressia 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 koordinované regulovaná s inými génnymi, špecificky zahrnutými do biosyntézy benzofenantri-dinových 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 génnymi biosyntézami morfínanových alkaloidov³⁴.

V roku 1996 Maldonado-Mendoza et al.³⁵ 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 klíčiacich semenáčach. 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 znáym TYDC génom pribudli nové gény: TYDC 6, TYDC 7, TYDC 8 a TYDC 9³⁶. Napriek intenzívnomu 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 hydroxykoričovej^{37, 38}.

Enzým (*S*)-*N*-metylkoklaurín-3'-hydroxyláza bola najprv preštudovaná v *Eschscholtzia californica*¹¹. 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 elicítácie. Znamená to teda, že metylkoklaurínhydroxyláza je indukovaný enzým¹².

Prvým enzýmom, špecifickým pre biosyntézu morfínanov, študovaným na úrovni nukleových kyselín, bola kodeinónreduktaza (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 aliel, ktoré sa exprimujú v rastline a bunkových kultúrach maku²¹. Následne autori Huang a Kutchanová¹² zistili, že kodeinónreduktaza je konštítutívnym enzýmom (gén neodpovedá na elicítáciu 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 vyizolovaného enzýmu a následnou RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) autori zistili sekvenciu cDNA. Otvorený čítací rámc je dlhý 1425 nukleotidov (474 AK). SalAT-cDNA neobsahuje žiadny signálny peptid, čo potvrzuje asociáciu SalAT s cytosolovou frakciou latexu. Na základe Southernovej hybridizácie sa predpokladá len jedna kópia SalAT v genóme maku siateho, pričom autori nevylučujú existenciu 2 veľmi podobných aliel³⁹.

Z biosyntetickej vetvy, vedúcej k sanguinarínu, bol na génovej úrovni študovaný berberín premostujúci enzym (BBE = berberine bridge enzyme). Facchini et al.²⁴⁾ 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 korení). K rapídnej 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 sekvenčiu, ktorá je zodpovedná za jeho translokáciu najprv do špecifickej subdomény endoplazmatického retikula a následne do vakuol, akumulujúcich sanguinarín. Táto doména nevykazuje žiadnu sekvenčnú homologiu 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 41⁴⁰⁾.

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

LITERATÚRA

- 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.
- Rueffer, M., Zenk, M. H.: Zeitschrift fur Naturforschung, 1987; 42, 319-332.
- Stadler, R., Kutchan, T. M., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1989; 28, 1083-1086.
- Kutchan, T. M.: In: The alkaloids: Chemistry and Biology. (Cordell, A. G., ed.), San Diego, Academic Press, 1998, 258-311.
- Bilková, A., Bezáková, L., Bilka, F., Pšenák, M.: Čes. slov. Farm., 2000; 49, 171-176.
- Samanani, N., Facchini, P. J.: Planta, 2001; 213, 898-906.
- Samanani, N., Facchini, P. J.: J. Biol. Chem., 2002; 277, 33878-33883.
- Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y. et al.: Eur. J. Biochem., 1994; 225, 125-131.
- Frick, S., Kutchan, T. M.: Plant J., 1999; 17, 329-339.
- Frenzel, T., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1990; 29, 3491-3497.
- Pauli, H. H., Kutchan, T. M.: Plant J., 1998; 13, 793-801.
- Huang, F., Kutchan, T. M.: Phytochemistry, 2000; 53, 555-564.
- Frenzel, T., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1990; 29, 3505-3511.
- Morishige, T., Tsujita, T., Yamada, Y., Sato, F.: J. Biol. Chem., 2000; 275, 23398-23405.
- Hashimoto, T., Yamada, Y.: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1994; 45, 257-285.
- De-Eknamkul, W., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1992; 31, 313-321.
- Gerardy, R., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1993; 32, 79-86.
- Gerardy, R., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1993; 34, 125-132.
- Lenz, R., Zenk, M. H.: J. Biol. Chem., 1995; 270, 31091-31096.
- Lenz, R., Zenk, M. H.: Eur. J. Biochem., 1995; 233, 132-139.
- Unterlinner, B., Lenz, R., Kutchan, T. M.: Plant J., 1999; 18, 465-475.
- Steffens, P., Nagakura, N., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1985; 24, 2577-2583.
- Dittrich, H., Kutchan, T. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991; 88, 9969-9973.
- Facchini, P. J., Penzes, C., Johnson, A. G., Bull, D.: Plant Physiol., 1996; 112, 1669-1677.
- Bauer, W., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1991; 30, 2953-2961.
- O'Keefe, B. R., Beecher, C. W. W.: Plant Physiol., 1994; 105, 395-403.
- Rueffer, M., Zenk, M. H.: Tetrahedron Lett., 1987; 28, 5307-5310.
- Tanahashi, T., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1990; 29, 1113-1122.
- Kammerer, L., De-Eknamkul, W., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1994; 36, 1409-1416.
- Sato, F., Takeshita, N., Fitchen, J. H. et al.: Phytochemistry, 1993; 32, 659-664.
- Rueffer, M., Zenk, M. H.: Phytochemistry, 1994; 36, 1219-1223.
- Facchini, P. J., Huber-Allanach, K. L., Tari, L. W.: Phytochemistry, 2000; 54, 121-138.
- Facchini, P. J., De Luca, V.: J. Biol. Chem., 1994; 269, 26684-26690.
- Facchini, P. J., De Luca, V.: Plant Cell, 1995; 7, 1811-1821.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Lopez-Meyer, M., Galef, J. R. et al.: Plant. Physiol., 1996; 110, 43-49.
- Facchini, P. J., Penzes-Yost, C., Samanani, N., Kowalchuk, B.: Plant Physiol., 1998; 118, 69-81.
- Facchini, P. J.: Phytochemistry, 1998; 49, 481-490.
- Stano, J., Nemec, P., Weissová, K. et al.: Phytochemistry, 1995; 38, 859-860.
- Grothe, T., Lenz, R., Kutchan, T. M.: J. Biol. Chem., 2001; 33, 30717-30723.
- Bird, D. A., Facchini, P. J.: Planta, 2001; 213, 888-897.

Došlo 12. 2. 2004.

Prijato 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., Stránská 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 tabuľce 1 na starně 306 uveden nesprávny vzorec. Uvádíme správný vzorec a autorom článku se omlouváme.

(heg)

