

TVORBA MORFÍNANOV: ENZÝMOVÝ A MOLEKULÁRNO-BIOLOGICKÝ ASPEKT

ANDREA BALAŽOVÁ a MIKULÁŠ PŠENÁK

Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, Slovenská republika

Došlo dňa 24.IX. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Biosyntéza primárnych prekursorov benzylizochinolínového skeletu
3. Biosyntéza (*S*)-retikulínu
4. Konverzia (*S*)-retikulínu na (*R*)-retikulín
5. Biosyntéza tebaínu z (*R*)-retikulínu
6. Biosyntéza kodeínu a morfinu z tebaínu
7. Záver

1. Úvod

Alkaloidy rastliny maku, *Papaver somniferum* L., patria do skupiny benzylizochinolínových (BICH) alkaloidov. Podľa charakteru uhlíkatého skeletu sa benzylizochinolínové alkaloidy rozdeľujú do niekoľkých podkupín. V rastline maku sú prítomné morfinany (morfin, tebaín, kodeín), sekotalydizochinolíny (narceín, nornarceín, narceínimid), ftalydizochinolíny (narkotín, narkotolín), benzyltetrahydroizochinolíny (retikulín, laudanozolín, kodamín, tetrahydropapaverín), aromatické benzylizochinolíny (papaverín, pakodín) a benzofenantridíny (sanguinarín).

Uhlíkový skelet alkaloidov rastliny maku vzniká z dvoch molekúl tyrozínu^{1,2}. Z dvoch molekúl tyrozínu sa tzv. pre-retikulínovou dráhou tvorí (*S*)-retikulín, ktorý je centrálnym medziproduktom tvorby všetkých benzylizochinolínových alkaloidov.

2. Biosyntéza primárnych prekursorov benzylizochinolínového skeletu

Podľa pôvodnej predstavy Wintersteina a Tiera z roku 1910 sa skelet benzylizochinolínových (BICH) alkaloidov tvorí Pickettovou-Spencerovou kondenzáciou dopamínu s 3,4-dihydroxyfenylacetaldehydom (dopal). Podľa tejto predstavy prvým medziproduktom s BICH štruktúrou je norlaudanozolín (tetrahydroxylovaný BICH). Pôvodne sa predpokladalo, že norlaudanozolín je medziproduktom aj tvorby morfinanov³.

V snahe objasniť spôsob zabudovávania sa oboch molekúl tyrozínu do skeletu morfinanov, infiltrovali sa do rastliny maku rádionuklidmi značené predpokladané prekursor. V prípade tyrozínu sa zistilo, že sa inkorporuje do oboch častí BICH skeletu, t.j. do benzylovej i do izochinolínovej časti^{4,5}. V prípade tyramínu sa ukázalo, že iba izochinolínová časť BICH skeletu morfinanov bola rádionuklidmi značená, t.j. tyramín nie je prekursorom benzylovej časti BICH^{6,7}. Rovnaké výsledky sa získali aj pri aplikácii rádionuklidom značenej dopy (3,4-dihydroxyfenylalanín) resp. dopamínu (3,4-dihydroxyfenyletylamín)¹. Tieto výsledky naznačili, že tyramín sa v rastline maku neoxiduje aminoxidázou na 4-hydroxyfenylacetaldehyd (tyral), ako sa to pozorovalo v bunkových kultúrach *Berberis canadensis*⁸. Z hľadiska formovania predstavy o pre-retikulínovej dráhe, boli cenné tie výsledky, ktoré sa pozorovali pri inkorporácii norkoklaurínu a koklaurínu do štruktúry morfinu. Vysoká účinnosť inkorporácie týchto prekursorov do morfinu ukázala, že nie tetrahydroxylovaný norlaudanozolín ale trihydroxylovaný norkoklaurín je prvým medziproduktom pre-retikulínovej dráhy s BICH štruktúrou. To ale znamená, že karbonyl-kondenzačnou jednotkou nie je dopal ale tyral. Keďže sa značený tyramín zabudoval len do izochinolínového segmentu alkaloidov rastliny maku, teda v rastline maku nie je prítomná aminoxidázová aktivita, potom je pôvod tyralu otvorený. Súčasne sa predpokladá, že tyral sa môže tvoriť dekarboxyláciou *p*-hydroxyfenylpyruvátu, ktorý vzniká z tyrozínu transamináciou⁸. Predpokladané metabolické vzťahy na rozhraní de

novu tvorby tyrozínu a biosyntézy norkoklaurínu znázorňuje obr. 1.

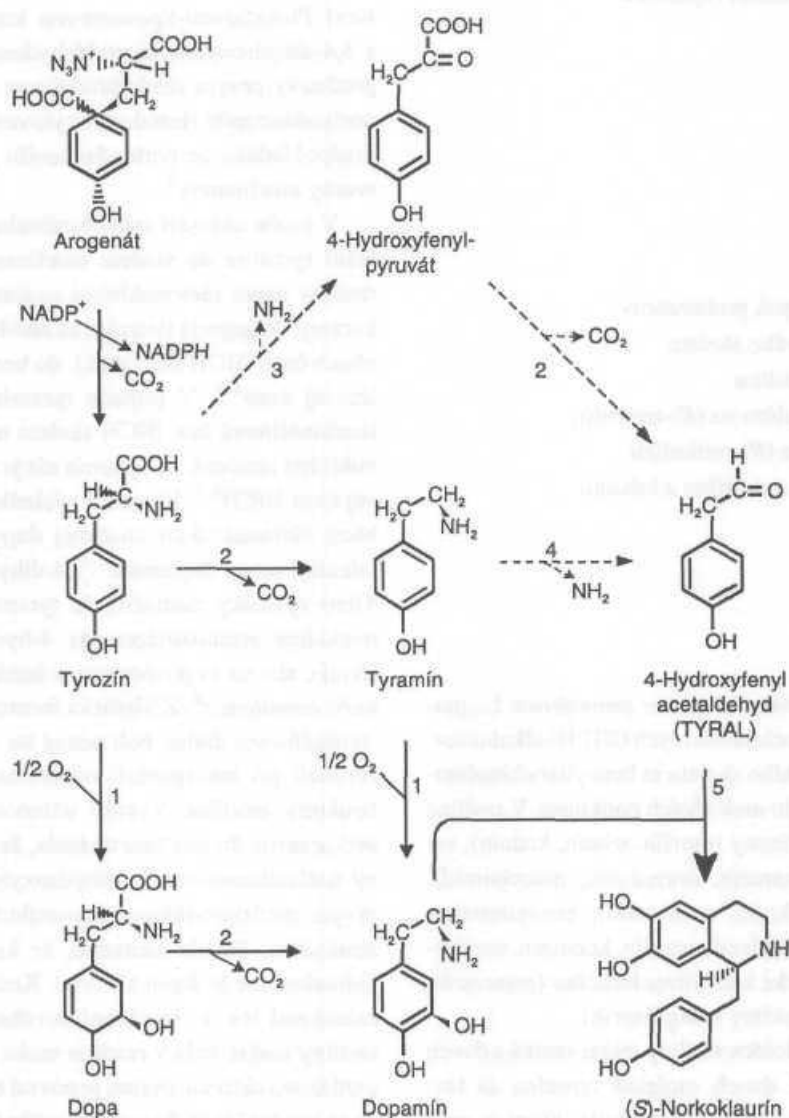
Transamináza, dekarboxyláza a fenoloxidáza boli prvé enzýmy, ktoré sa v rastline maku sledovali vo vzťahu k tvorbe morfínových alkaloidov⁹. Neskôr sa tieto enzýmy dokázali aj v izolovanom latexe maku¹⁰⁻¹⁴.

Schopnosť fenoloxidázy z maku hydroxylovať tyrozín na dopu pozoroval aj Asghar a Siddiqi¹⁵. Imobilizované bunky rastliny maku si uchovávali tyrozín/dopa-dekarboxylázovú aktivitu v priebehu niekoľkých mesiacov¹⁶.

Enzýmy zúčastňujúce sa premeny tyrozínu na dopu a tyral sa v rastline maku dokázali a čiastočne charaktéri-

zovali. Z nich sa zatiaľ ani jeden neizoloval v homogénnej forme a nezhodnotili sa ich molekulové parametre¹⁷. Molekulová analýza spoločnosti génov pre tyrozín/dopa-dekarboxylázu sa začala v roku 1994.

Pri porovnávaní primárnych štruktúr dekarboxyláz aromatických aminokyselín sa zistili dve sekvenčne konzervované segmenty v polypeptidovom reťazci dekarboxyláz. Pomocou týchto segmentov sa pripravili polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) primery pre amplifikáciu segmentu genómovej DNA maku a jedného inzertu autentickej tryptofánde karboxylázy (TDC) z *Catharanthus roseus*¹⁸. PCR produkty a inzerty sa použili ako sondy do cDNA



Obr. 1. Enzýmy v biosyntéze norkoklaurínu v rastlinách tvoriacich BICH alkaloidy. Fenoloxidáza (1), dekarboxyláza (2), transamináza (3), amínoxidáza (4), norkoklaurínsyntáza (5)

(komplementárna DNA vznikajúca reverznou transkripciou mediátorovej RNA) knižnice kľúčnej rastliny maku. Takto sa zistili tri cDNA pre tyrozín/dopa-dekarboxylázu (dve cDNA - cTyDC3, cTyDC2 s použitím TDC inzertu a jedna cDNA - cTyDC3 pomocou PCR produktov. Hodnotením genómovej knižnice maku s cTyDC 1 sa identifikovali dva genómové klony - gTyDC1 a gTyDC4. Primárna štruktúra gTyDC1 bola rovnaká ako cTyDC1 a primárna štruktúra gTyDC4 bola na 90 % identická s cTyDC1. Na základe sekvenčnej príbuznosti sa geny pre tyrozín/dopa-dekarboxylázu rastliny maku rozdelili do dvoch podskupín: cTyDC 1, gTyDC4 a TyDC2, cTyDC3. V rámci podskupín je sekvenčná homológia 90 % a medzi podskupinami je menej než 75 % homológia. Klony cTyDC1 a cTyDC2 (reprezentanti oboch podskupín) sa použili na **skrining** restriktčných fragmentov genómovej DNA maku. Pre fragmentáciu DNA sa použili štyri restriktčné endonukleázy. V každom súbore sa identifikovalo 6-8 pozitívnych pásov s cTyDC1 a s cTyDC2 4-6 pozitívnych pásov, t.j. tyrozín/dopa-dekarboxyláza v rastline maku sa zdá byť kódovaná spoločnosťou 10 až 14 génov. Po expresii gTyDC1 a cTyDC2 v *E. coli* príslušné enzýmy vykazovali vysokú špecifitu pre tyrozín a dopu. Fenylalanín a tryptofán neslúžili ako substrát pre tieto enzýmy¹⁹. RNA blot-hybridizačnou analýzou s cTyDC 1 a cTyDC2 sa sledovala orgánovo-špecifická expresia génov tyrozín/dopa-dekarboxylázy. TyDC1 - podobné transkripty sa primárne exprimovali v koreni a transkripty TyDC2 v koreni a stonke²⁰. V ostatných sledovaných orgánoch rastliny maku (korene, stonky, listy, kvetné lupienky, kališné listy, piestik, tyčinky) bola expresia týchto génov pozoruhodne nízka. Vo vyvíjajúcej sa makovici sa TyDC1 a TyDC2 transkripty identifikovali len do štádia oplodnenia. V rastúcich makoviciach sa transkripty týchto génov nedetekovali.

Obsah morfinu sa v latexe rastúcich a dozrievajúcich makovic zvyšuje. Hladina tyrozínu v latexe z týchto makovic je relatívne nízka, kým obsah tyramínu a najmä dopy koreluje s obsahom morfinu. Či sa morfín tvorí *de novo* v makoviciach alebo sa translokuje z iných častí rastliny zostáva otvorenou otázkou, rovnako ako pôvod tyramínu (dopy) v latexe makovic.

Ďalší člen - TyDC5 - genového spoločenstva pre tyrozín/dopa-dekarboxylázu sa izoloval z genómovej knižnice rastliny maku²¹. Kódujúca oblasť TyDC5 sa exprimuje prevažne v koreni a v kľúčnej rastline maku. Expresia tohto klonu v latexe a v *in vitro* kultúrach maku bola sotva detegovateľná. Orgánovo špecifická expresia TyDC5 a jej primárna štruktúra je podobná klonu TyDC1¹⁸.

3. Biosyntéza (S)-retikulínu

Retikulín je Mličovým intermediátom v biosyntéze všetkých benzylochinolínových báz. Výskyt dvoch izomérov (R) a (S) podmieňuje tvorbu štruktúrne rôznych typov benzylochinolínových alkaloidov.

Biosyntéza (S)-retikulínu z dopamínu a tyralu je katalyzovaná sekvenciou piatich enzýmových reakcií (obr. 2). Keďže pre-retikulínová dráha je spoločná pre tvorbu rôznych štruktúrnych typov BICH alkaloidov, mohli sa použiť rôzne druhy rastlín a ich *in vitro* kultúry na identifikáciu jednotlivých enzýmov pre-retikulínovej dráhy.

Objasnenie biogenetickej príbuznosti koklaurínu a retikulínu malo za následok revíziu pôvodnej norlaudanozolínovej pre-retikulínovej dráhy. Tri enzýmy v tvorbe retikulínu sa následne premenovali, a to (S)-norlaudanozolínsyntáza na (S)-norkoklaurínsyntázu, (R),(S)-norlaudanozolín-6-O-metyltransferáza na (S)-norkoklaurín-6-O-metyltransferázu a norretikulín-N-metyltransferáza na (S)-koklaurín-N-metyltransferázu²². Donorom metylovej skupiny u týchto metyltransferáz je S-adenozylmetionín.

(S) - Norkoklaurínsyntáza

Je prvým enzýmom pre-retikulínovej dráhy a katalyzuje stereošpecifickú kondenzáciu dopamínu s tyralom (*p*-OH-fenylacetaldehydom). (S)-Norkoklaurínsyntáza sa izolovala a parciálne purifikovala z bunkových kultúr *Eschscholtzia tenuifolia*^{23,24}. (S)-Norkoklaurínsyntáza je cytozolový enzým s relatívnu molekulovou hmotnosťou 16 000. Hodnoty Michaelisovej konštanty - K_m pre dopamín a tyral sú 1,5 mM a 0,9 mM (0,7 mM). pH optimum pre tyral je mierne posunuté do kyslej oblasti (pH - 7,4) oproti pH optimu pre dopal (pH - 7,8). Enzým je vysoko špecifický pre *p*-OH-fenylacetaldehyd, pričom štruktúrne veľmi blízky fenylpyruvát ako substrát neakceptuje. Diskovou elektroforézou a izoelektrickou fokusáciou 40-krát purifikovaného enzýmového preparátu z bunkových kultúr *E. tenuifolia* sa identifikovali štyri izoenzymové formy (S)-norkoklaurínsyntázy.

(S) - Norkoklaurín-6-O-metyltransferáza

Druhý enzým pre-retikulínovej dráhy katalyzuje tvorbu koklaurínu (6-O-metylnorkoklaurínu). Tento enzým sa izoloval a purifikoval zo suspenzných kultúr *Argemone platyceras*²⁵. 6-O-Metyltransferáza je cytozolový enzým s rela-

tívnou molekulovou hmotnosťou 47 000. Pre katalytický účinok enzýmu je esenciálna SH-skupina.

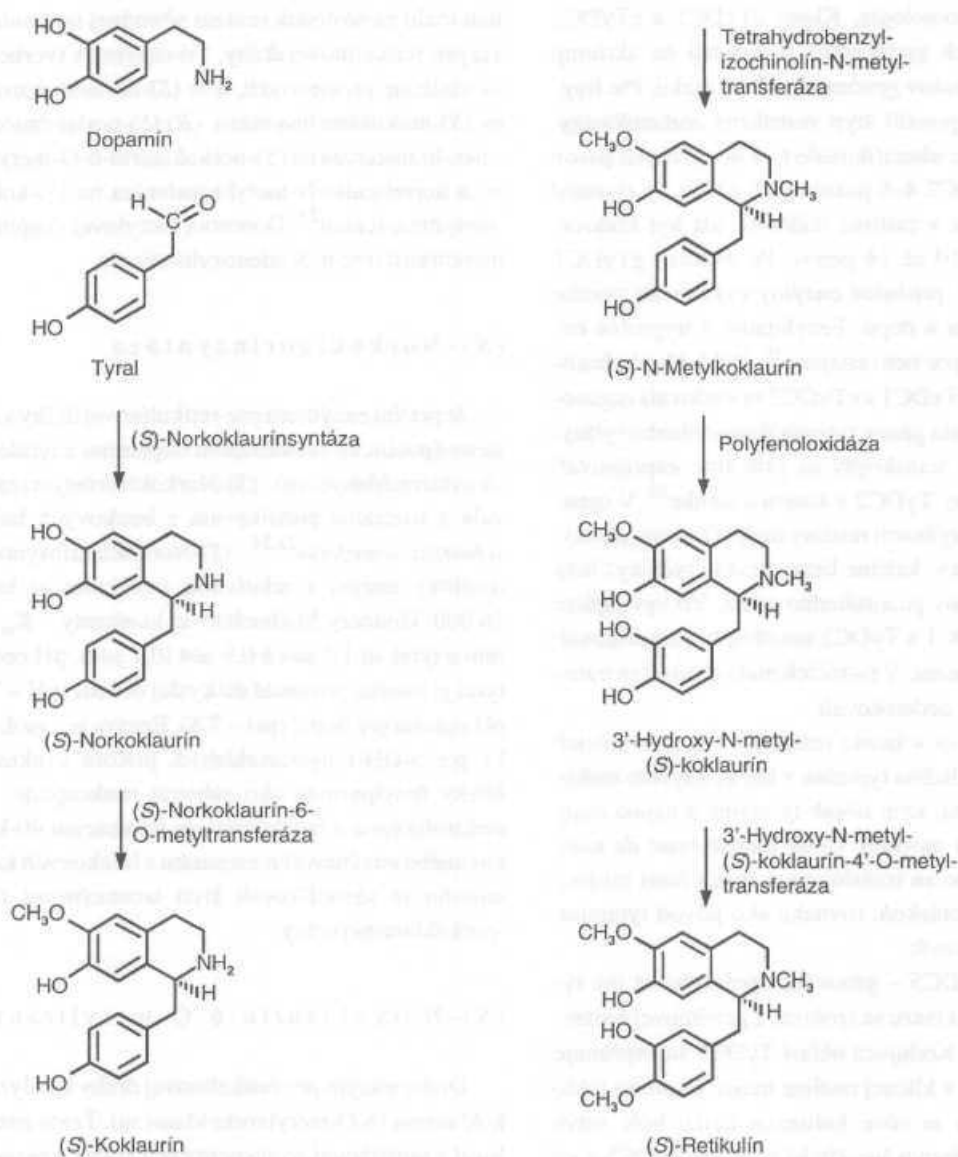
(S)-Koklaurín-N-metyltransferáza

N-Metylačná aktivita (S)-koklaurín-N-metyltransferázy sa testovala na preparátoch voľných buniek z viac ako päťdesiatich bunkových kultúr rastlín produkujúcich BICH alkaloidy. Aby sa vylúčili interferencie s O-metylačnými enzýmami, použil sa ako substrát tetrahydropapaverín²⁶. Parciálne purifikovaný enzým sa získal z bunkových kultúr *Berberis vulgaris*. Je to solubilný enzým s relatívnou molekulovou hmotnosťou 68 000. Ako substrát akceptuje len

tetrahydroizochinolínové alkaloidy. K_m hodnota pre (R)-tetrahydropapaverín je 0,2 mM a pre (S)-tetrahydropapaverín je 0,03 mM.

Fenoloxidáza

Predposledným krokom v biosyntéze (S)-retikulínu je hydroxylácia na 3'-uhlíku benzylového kruhu. Táto hydroxylácia je katalyzovaná askorbát-dependentnou fenoloxidázou²². Homogénny enzýmový preparát sa získal z bunkových kultúr *Berberis stolonifera*. Dimér fenoloxidázy (rel. mol. hmot. 60 000) je zložený z dvoch identických podjednotiek (36 000). Tento enzým má širokú



Obr. 2. Biosyntetická dráha tvorby (S)-retikulínu

substrátovú špecifitu. Purifikovaná fenoloxidáza s rovnakou účinnosťou hydroxyluje (*R*)-, (*S*)-koklaurín, (*R*)-, (*S*)-*N*-metylkoklaurín, tyrozín a tyramín. Tieto výsledky naznačujú, že rovnaký enzým hydroxyluje tyrozín, tyramín a *N*-metylkoklaurín. Fenoloxidáza je lokalizovaná v membráne plastidov vo fotosyntetických a nefotosyntetických pletivách vyšších rastlín²⁷. Enzým je kódovaný jadrovou DNA.

3'-Hydroxy-*N*-metyl-(*S*)-retikulín-4'-*O*-metyltransferáza

Posledný krok v (*S*)-retikulínovej biosyntéze katalyzuje 4'-*O*-metyltransferáza (*S*-adenozyl-*L*-metionín:3'-hydroxy-*N*-metyl-(*S*)-koklaurín-4'-*O*-metyltransferáza). Tento *S*-adenozyl-špecifický enzým sa pozoroval v bunkových kultúrach odvodených z 36 druhov rastlín zo štyroch rastlinných čeladi²⁸. V purifikovanom enzýmovom preparáte z bunkových kultúr *Berberis koetianeana* sa identifikovali dva proteíny, jeden s 4'-*O*-metylačnou a druhý s 6-*O*-metylačnou aktivitou. Kinetické hodnoty 4'-*O*-metyltransferázy je možné stanoviť s 3'-hydroxymetylkoklaurínom ako substrátom bez vedľajšej interferencie 6-*O*-metyltransferázovej aktivity. 4'-*O*-Metyltransferáza je (*S*)-stereošpecifická a 4'-OH regionálne špecifický enzým. Relatívna mo-

lekulová hmotnosť enzýmu (40 000) sa stanovila SDS elektroforézou. 4'-*O*-Metyltransferáza je stabilný enzým pri -20 °C. Svoju aktivitu 6-*O*-metyltransferáza stráca v priebehu troch mesiacov. Enzým je spätne inhibovaný (*S*)-retikulínom a inými alkaloidmi.

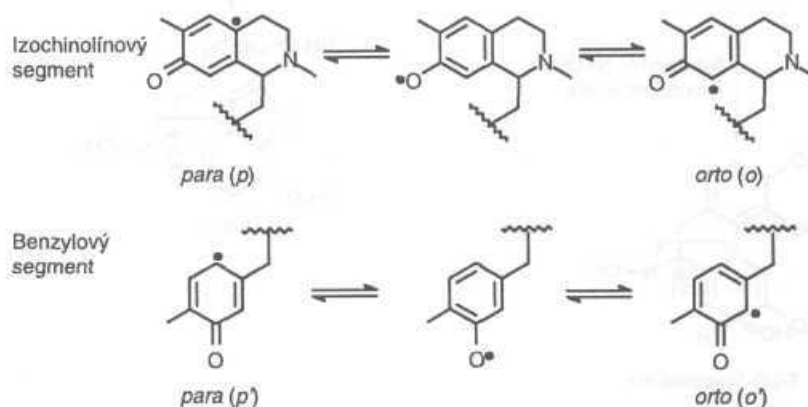
4. Konverzia (*S*)-retikulínu na (*R*)-retikulín

Produktom pre-retikulínovej biosyntetickej dráhy je (*S*)-izomér retikulínu. Stereochemia prirodzeného (*S*)-retikulínu nekorešponduje s konfiguráciou morfinových alkaloidov. V snahe zistiť, ktorý izomér retikulínu je prekursorom morfinu, infiltrovali sa oba enantioméry do rastliny maku zvlášť. Do štruktúry tebaínu sa oba enantioméry inkorporovali rovnakým dielom. Experimenty s retikulínom značeným ³H na C-1 a ¹⁴C v ďalšej pozícii ukázali, že jeho inkorporácia do tebaínu nebola sprevádzaná poklesom ¹⁴C rádioaktivity, ale výraznou stratou trícia z C-1 (cit. ³). Strata rádioaktivity a zmena konfigurácie na C-1 sa vysvetlila existenciou 1,2-dehydroretikulínového iónu. 1,2-Dehydroretikulínový ión sa neskôr dokázal ako prirodzený produkt v rastline maku siateho.

Enzým schopný katalyzovať dehydrogenáciu ³H značeného (*S*)-retikulínu bol izolovaný a purifikovaný z *Ber-*



Obr. 3. Konverzia (*S*)-retikulínu na (*R*)-retikulín



Obr. 4. Mezoméne radikály benzyltetrahydroizochinolínu

beris a *Papaver somniferum*. Enzým je stereošpecifický pre substrát s (*S*)-konfiguráciou a je identický s (*S*)-tetrahydroprotoberberínoxidázou.

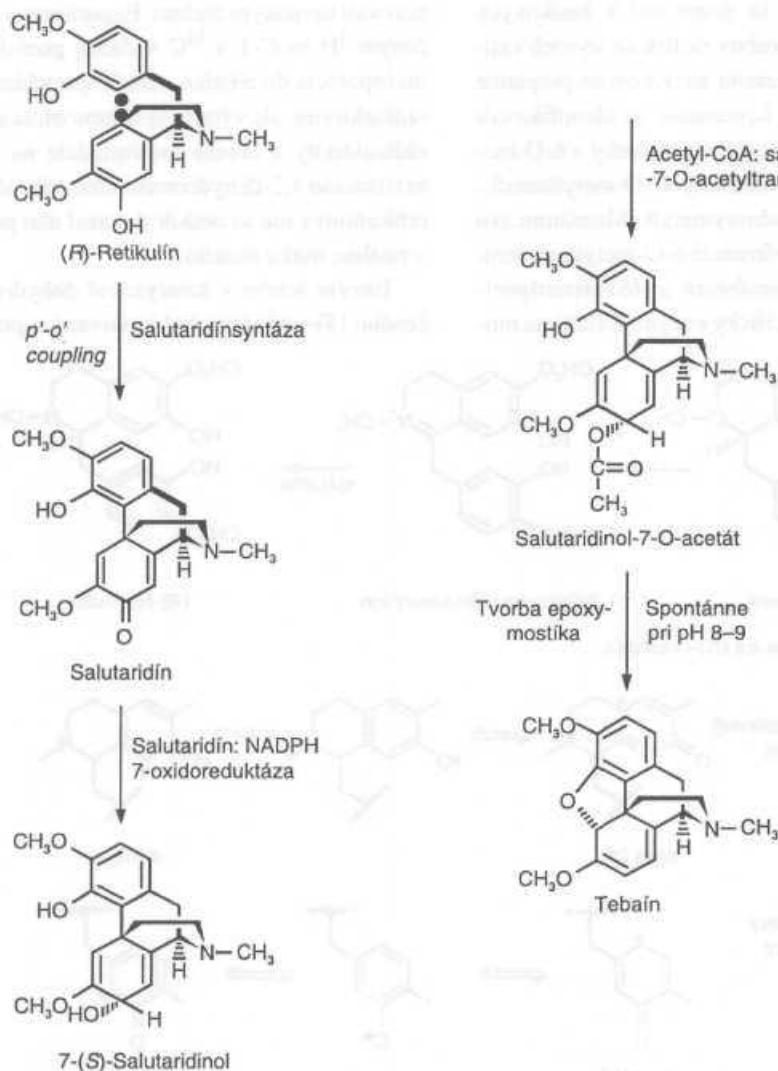
1,2-Dehydroretikulínreduktáza

Redukciu 1,2-dehydroretikulínového iónu na (*R*)-retikulín katalyzuje NADPH-dependentnou 1,2-dehydroretikulínreduktázou²⁹ (obr. 3). Štandardné stanovenie 1,2-dehydroretikulínreduktázy je založené na báze rozpustnosti (*R*)-retikulínu a nerozpustnosti 1,2-dehydroretikulínu v organických rozpúšťadlách. Aktivita 1,2-dehydroretikulínreduktázy bola preukázaná len v rastlinách produkujúcich morfinové alkaloidy. Retikulínreduktáza je rozpustný proteín s relatívnou molekulovou hmotnosťou 30 000, K_m

hodnoty pre 1,2-dehydroretikulína NADPH sú 10 μ M resp. 7 μ M. 1,2-Dehydronorretikulín alebo 1,2-dehydrokoklaurín neslúžili ako substráty pre 1,2-dehydroretikulínreduktázu.

5. Biosyntéza tebaínu z (*R*)-retikulínu

Princíp oxidačného fenolického spájania popísali Barton a Cohen³⁰. Stratou elektrónu vytvára fenolátový ión niekoľko mezomérnych radikálov - na samotnom kyslíkovom atóme a na uhlíkovom kruhu v *orto* alebo *para* pozícii ku kyslíku. V molekule retikulínu je každý z dvoch arylových cyklov schopný vytvárať fenoxyl radikály (obr. 4). Spájanie radikálov môže prebehnúť intermolekulárnym



Obr. 5. Biosyntetická dráha tvorby tebaínu z (*R*)-retikulínu

mechanizmom s druhou molekulou (napr. pri tvorbe bis-benzylizochinolínov) alebo intramolekulárne. Intramolekulárnym radikálovým spájaním v benzylizochinolínovom skelete vznikne nová C-C väzba v *orto* alebo *para* pozíciách v závislosti od polohy voľnej OH skupiny na oboch arylových cykloch. Fenolickým spájaním sa tricyklický retikulín transformuje na tetracyklickú bázu. (*R*)-Retikulín sa transformuje na tebaín katalytickým účinkom troch enzýmov (obr. 5).

Salutaridínsyntáza

Premenu (*R*)-retikulínu na salutaridín katalyzuje salutaridínsyntáza³¹. Enzým polohovo- a stereoselektívne katalyzuje *o*'-*p* oxidatívne spájanie v molekule (*R*)-retikulínu. Aktivita enzýmu bola stanovená rádioimunologicky, HPLC a rádiochromatografiou na tenkej vrstve s použitím (*R*)-[N-¹⁴CH₃]-retikulínu ako substrátu. Salutaridínsyntáza je mikrozomálny proteín. Mikrozomálna frakciabola pripravená z pletív a suspenzných kultúr *Papaver somniferum*, ktoré akumulujú tebaín len v malom množstve. Pre aktivitu enzýmu sú esenciálne NADPH a O₂. *K_m* hodnoty boli určené pre (*R*)-retikulín 17 μM a pre NADPH 150 μM. Najvyššie enzymové aktivity sa stanovili vo výhonkoch a listoch trojmesačných rastlín maku. Salutaridínsyntáza sa neidentifikovala v latexe maku a ani v bunkových kultúrach rastlín produkujúcich významné množstvo BICH alkaloidov. Salutaridínsyntáza je NADPH-, kyslík- a cytochróm P-450-dependentný enzým špecifický pre druh *Papaver*.

Salutaridín: NADPH 7-oxidoreduktáza

Redukcia salutaridínu na 7-(*S*)-salutaridinol je druhým krokom v premene (*R*)-retikulínu na tebaín. Aktivitu enzýmu je možné stanoviť reverznou enzýmovou reakciou. Táto metóda je založená na rozpustnosti 7-(*S*)-salutaridinolu a nerozpustnosti salutaridínu v organických rozpúšťadlách. Ak sa použije [7-³H]-salutaridinol ako substrát pre reverznú reakciu, vodnú fázu je možné použiť na sledovanie uvolnenia ³H zo substrátu. Enzým bol izolovaný a purifikovaný z bunkových kultúr maku. Salutaridínreduktáza je solubilný monomérny proteín (rel. molekulová hmotnosť 52 000). pH optimum priamej reakcie (pH 6,0-6,5) sa líši od pH optima reverznej reakcie, ktorá si vyžaduje pH 9,0-9,5. Salutaridínoxidoreduktáza je vysoko špecifická pre salutaridín/7-(*S*)-salutaridinol. *K_m* hodnoty boli stanovené pre salutaridín 23 μM a pre NADPH 125 μM. V rámci orgánovej distribúcie enzýmu v rastline maku sa najvyššia

aktivita pozorovala v tobolkách. V koreňoch a vo výhonkoch sa aktivita salutaridínoxidoreduktázy nepotvrdila. Aktivita salutaridínoxidoreduktázy sa pozorovala aj v kľúčnych rastlinách maku, pričom najvyššia špecifická aktivita sa určila v bunkových kultúrach maku. V latexe, v semenách a v listoch dozrievajúcich rastlín maku nebola prítomná žiadna aktivita salutaridínoxidoreduktázy.

Acetyl-koenzým A:

salutaridinol-7-O-acetyltransferáza

Ak sa 7-(*S*)-salutaridinol a 7-(*R*)-salutaridinol separovane infiltrovali do rastlín maku, len 7-(*S*)-salutaridinol sa inkorporoval do štruktúry morfínových alkaloidov³². Podobné výsledky boli dosiahnuté aj s bunkovými kultúrami maku³³. Ak sa použije mitochondriálna frakcia z bunkových kultúr maku ako enzýmový preparát, je možné sledovať premenu 7-(*S*)-salutaridinolu na tebaín. Prítomnosť acetyl-CoA v reakčnej zmesi významne zosilňuje tvorbu tebaínu. Enzým je solubilný proteín o relatívnej molekulovej hmotnosti 50 000 (cit.³³). 7-O-Acetylsalutaridinol je produkt reakcie katalyzovanej acetyl-CoA-salutaridinol-acetyltransferázou, ktorý sa spontánne transformuje na tebaín pri alkalických hodnotách pH. Spontánna transformácia 7-O-acetylsalutaridinolu na tebaín je posledným krokom v biosyntéze tebaínu.

6. Biosyntéza kodeínu a morfinu z tebaínu

V *Papaver somniferum* a *Papaver setigerum* sa tebaín metabolizuje na morfín cez kodeín a kodeinón^{34,35}. 6-O-Demetyláciou tebaínu vzniká neopinón, \ štruktúre ktorého sa kyslíkový atóm na C-6 zachováva. Neopinón je vo vodných roztokoch nestabilný a transformuje sa na kodeinón. Izomerizácia neopinónu na kodeinón sa detailne analyzovala³⁶. V rovnovážnom stave reakčná zmes obsahuje 52 % kodeinónu a 48 % neopinónu. Pridaním purifikovanej kodeinónreduktázy do rovnovážnej zmesi kodeinón/neopinón sa pozoruje rýchla akumulácia kodeínu. Tieto výsledky definitívne potvrdzujú, že v rastlinných bunkách existuje neopinón v neenzymovej rovnováhe s kodeinónom. Kodeinónreduktáza túto rovnováhu kvantitatívne posúva v prospech kodeínu.

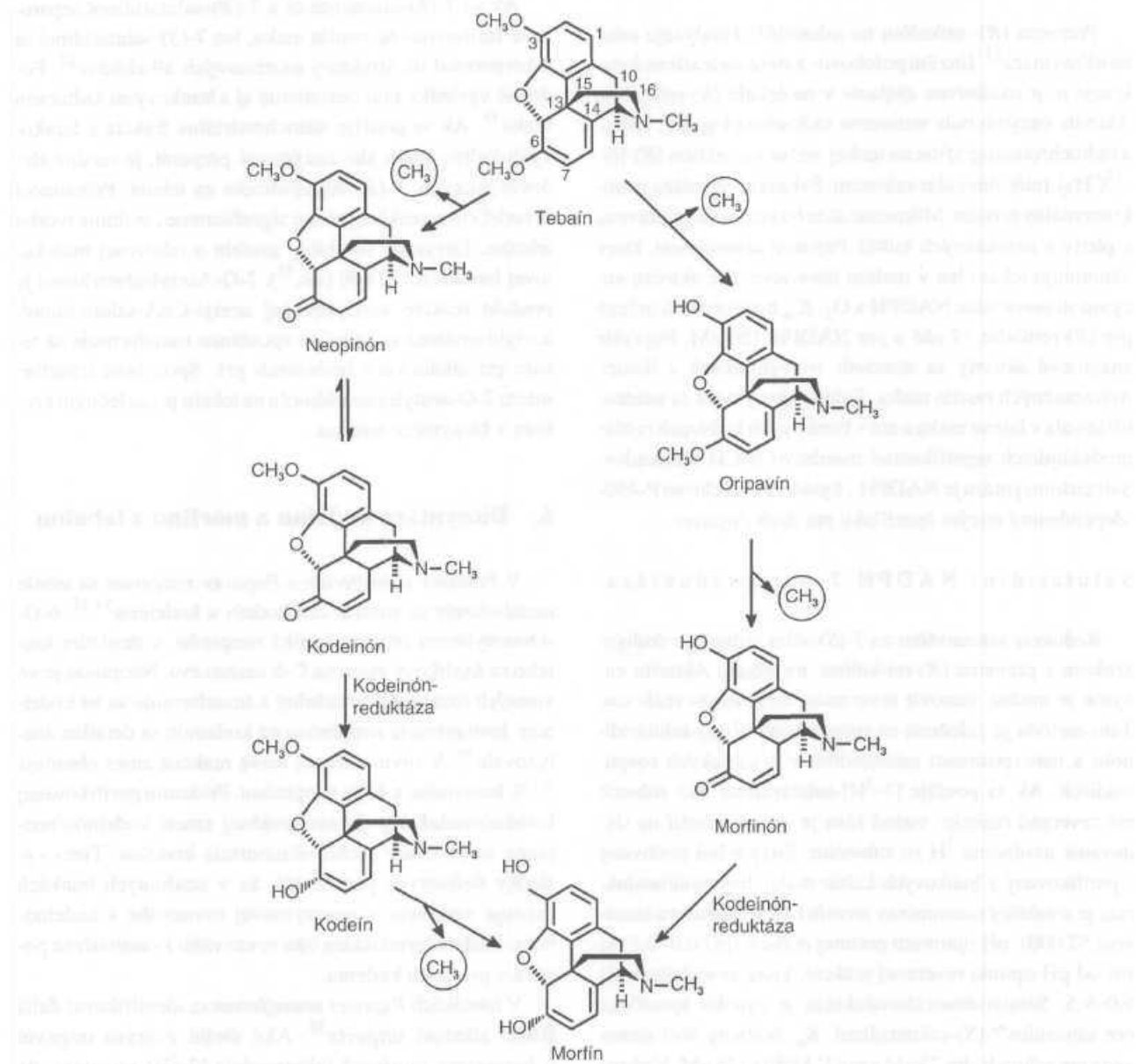
V tobolkách *Papaver somniferum* sa identifikoval ďalší BICH alkaloid oripavín³⁷. Akú úlohu zohráva oripavín v biosyntéze morfinu? Inkorporácia [2-³H]-oripavínu do morfinu a morfinónu potvrdila ďalšiu možnosť tvorby mor-

finu z tebaínu v rastline maku. Intermediátmi tejto biosynthetickej dráhy sú oripavín a morfinón³⁸ (obr. 6).

Kodeinón: NADPH oxidoreduktáza

In vitro enzýmová redukcia kodeinónu na kodeín bola prvýkrát pozorovaná v hrubom enzýmovom extrakte z bun-
kových kultúr³⁹ a z diferencovaných rastlín maku⁴⁰.
V týchto štúdiách sa použil NADH ako kosubstrát pre
konverziu kodeinónu na kodeín. V extraktoch z jednot-
livých orgánov rastlín maku boli hodnoty aktivity kodei-

nónreduktázy rovnaké. Najvyššia aktivita kodeinónreduk-
tázy sa pozorovala v celých kvitnúcich rastlinách. NADPH-
dependentná kodeinónreduktáza sa izolovala a purifikova-
la z bunkových kultúr a z toboliek rastlín maku^{41,42}. Akti-
vita enzýmu sa stanovuje priamou reakciou, pri ktorej sa
určuje množstvo spotrebovaného NADPH po extrakcii ko-
deínu a kodeinónu do chloroformu. Pri stanovení aktivity
spätou reakciou sa stanovovalo množstvo uvoľneného
trícia vo vodnej fáze pri použití [6-³HJ-kodeínu ako sub-
strátu. Purifikovaná kodeinónoxidoreduktáza je solubilný
monomérny proteín s relatívnou molekulovou hmotnosťou



Obr. 6. Biosynetické dráhy tvorby morfinu z tebaínu

35 000. V purifikovanom enzýme z *Papaver somniferum* sa identifikovali dve izoformy. Homogénna kodeinón-oxidoreduktáza je NADPH/NADP špecifický enzým. Bez NADPH alebo v prítomnosti NADH/NAD reakcia neprebieha. Najvyššia aktivita enzýmu bola pozorovaná v toboľkách. Purifikovaná kodeinónoxidoreduktáza špecificky a stereoselektívne redukuje kodeinón na kodeín a morfinón na morfin. Aj niektoré syntetické analógy (hydrokodón, naloxon, naltrexon a dihydrokodeín) môžu byť substrátmi kodeinónoxidoreduktázy. Z uvedených poznatkov vyplýva, že kodeinónoxidoreduktáza sa zúčastňuje oboch biosyntetických dráh vedúcich od tebaínu k morfinu.

Na úseku enzymológie tvorby morfinanov zostáva otvorená otázka pôvodu tyralu a proces demetylácie pri premene tebaínu na morfin.

7. Záver

Morfinany tvoria podskupinu benzylizochinolínových alkaloidov. Ich uhlíkový skelet vzniká z dvoch molekúl tyrozínu. Z jednej molekuly tyrozínu sa tvorí dopamín (amín-kondenzačná jednotka) účinkom tyrozín/dopa-dekarboxylázy a fenoloxidázy. V rastline maku siateho tyrozín/dopa-dekarboxylázu kóduje spoločenstvo 10-14 génov. Aminooxidáza sa zatiaľ v rastline maku nedokázala, t.j. tyramín nie je bezprostredným prekursorom *p*-hydroxyfenylacetaldehydu - tyral (karbonyl-kondenzačná jednotka). Predpokladá sa, že tyral sa tvorí dekarboxyláciou *p*-hydroxyfenylpyruvátu, ktorý vzniká z tyrozínu transamináciou. Kondenzáciou dopamínu s tyralom vzniká (*S*)-norkoklaurín, prvý medziprodukt s benzylizochinolínovou štruktúrou. V rámci pre-retikulínovej dráhy sa (*S*)-norkoklaurín transformuje na (*S*)-retikulín účinkom regio-selektívnych (*S*)-adenozylmetionín-špecifických O- a N-metyltransferáz a fenoloxidázy. Premena (*S*)-retikulínu na (*R*)-retikulín prebieha cez 1,2-dehydoretikulín. (*S*)-Retikulín sa v prvej reakcii oxiduje na 1,2-dehydoretikulínový ion, ktorý je substrátom pre NADPH-špecifickú reduktázu. Kritickou reakciou v tvorbe morfinanov je premena (*R*)-retikulínu na salutaridín, z ktorého cez salutaridinol a salutaridinolacetát vzniká tebaín. Tvorbu salutaridínu z (*R*)-retikulínu (nová intramolekulová C-C väzba sa tvorí oxidáčnym fenolickým spájaním) katalyzuje špecifický, regio- a stereoselektívny mikrozomálny P-450 dependentný enzýmový systém. Účinkom NADPH-špecifickej salutaridín-reduktázy a acetyl-CoA-salutaridínacetyltransferázy sa salutaridín mení na acetylsalutaridinol, ktorý sa spontánne

transformuje na tebaín. Z tebaínu sa cez kodeinón tvorí kodeín a následne morfin. Prítomnosť oripavínu v rastline maku naznačuje možnosť tvorby morfinu cez oripavín a morfinón. NADPH-špecifická kodeinón/morfinón-reduktáza katalyzuje redukcii kodeinónu na kodeín, resp. morfinónu na morfin. Enzýmový aspekt „demetylačných“ reakcií pri premene tebaínu na morfin sa zadal' nesledoval.

Za podporu dokujeme VULM, Modra a SLOVAKO-FARMA, Hlohovec.

LITERATÚRA

1. Spencer I. D.: *Comprehensive Biochemistry* (Florkin N., Stotz E. H., ed.), str. 300. Elsevier/North-Holland, New York 1968.
2. Mothes K., Schiitte H. R., Luckner M.: *Biochemistry of Alkaloids*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1985.
3. Battersby A. R., Foulkes D. M., Binks R.: *J. Chem. Soc.* 1965, 3323.
4. Battersby A. R., Binks R., Harper B. I. T.: *J. Chem. Soc.* 1962, 3534.
5. Neubauer D.: *Arch. Pharm.* 295, 747 (1965).
6. Roberts M. F., Kutchan T. M., Brown R. T., Coscia C. J.: *Planta* 172, 230 (1987).
7. Loeffler S., Stadler R., Nagakura N., Zenk M. H.: *J. Chem. Soc. (Chem. Commun.)* 1987, 1160.
8. Rueffer M., Zenk M. H.: *Z. Naturforsch.* 42c, 319 (1987).
9. Jindra A., Kovács P., Pittnerová Z., Pšenák M.: *Phytochemistry* 5, 1303 (1966).
10. Roberts M. F.: *Phytochemistry* 10, 3021 (1971).
11. Roberts M. F.: *Phytochemistry* 13, 119 (1974).
12. Antoun M. D., Roberts M. F.: *Phytochemistry* 14, 909 (1975).
13. Roberts M. F., Antoun M. D.: *Phytochemistry* 17, 1083 (1978).
14. Roberts M. F., McCarty D., Kutchan T. N., Coscia C. J.: *Arch Biochem. Biophys.* 222, 599 (1983).
15. Asghar S. S., Siddiqi N.: *Enzymologia* 39, 289 (1969).
16. Stano J., Nemec P., Weissová K., Kovács P., Kákonyiová D., Lišková D.: *Phytochemistry* 38, 859 (1995).
17. Hashimoto T., Yamada Y.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 257 (1994).
18. Facchini P. J., De Luca V.: *J. Biol. Chem.* 269, 26684 (1994).

19. Facchini, P. J., De Luca V.: *Phytochemistry* 58, 1119 (1995a).
20. Facchini P. J., De Luca V.: *The Plant Cell* 7, 1811 (1995b).
21. Maldonado-Mendoza I. E., López-Meyer M., Galef J. R., Brunett R. J., Nessler C. G.: *Plant Physiol.* 110, 43 (1996).
22. Loeffler S., Zenk M. H.: *Phytochemistry* 29, 3499 (1990).
23. Rueffe M., El-Shagi H., Nagakura N., Zenk M. H.: *FEBS Lett.* 129, 5 (1981).
24. Schumacher H. M., Rueffer M., Nagakura N., Zenk M. H.: *Planta Med.* 48, 212 (1983).
25. Rueffer M., Nagakura N., Zenk M. H.: *Planta Med.* 49, 131 (1983).
26. Watt C. K., Steffens P., Zenk M. H.: *Z. Naturforsch.* 41c, 126 (1986).
27. Shermann T. D., Vaughn K. C., Duke S. O.: *Phytochemistry* JO, 2499 (1991).
28. Frenzel T., Zenk M. H.: *Phytochemistry* 29, 3505 (1990).
29. De-Eknamkul W., Zenk M. H.: *Phytochemistry* 31, 813 (1992).
30. Barton D. H. R., Cohen T.: *Some Biogenetic Aspects of Phenol Oxidation*, str. 117. Festschr. Stoll, Birkhäuser, Basel 1957.
31. Gerardy R., Zenk M. H.: *Phytochemistry* 32, 79 (1993).
32. Lotter H., Gollwitzer J., Zenk M. H.: *Tetrahedron Lett.* 33, 2443 (1992).
33. Lenz R., Zenk M. H.: *Tetrahedron Lett.* 35, 3897 (1994).
34. Battersby R. A., Martin J. A., Brochmann-Hansen E.: *J. Chem. Soc. (C)*, 1967, 1785.
35. Parker H. I., Blaschke G., Rapoport H.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, 1276 (1972).
36. Gollwitzer J., Lenz R., Hampp N., Zenk M. H.: *Tetrahedron Lett.* 34, 5703 (1993).
37. Nielsen B., Røe J., Brochmann-Hansen E.: *Planta Med.* 48, 205 (1983).
38. Brochmann-Hansen E.: *Planta Med.* 50, 343 (1984).
39. Furuya T., Nakano M., Joshikawa T.: *Phytochemistry* 17, 891 (1978).
40. Hodges, C. C., Rapoport H.: *Phytochemistry* 19, 1681 (1980).
41. Lenz R., Zenk M. H.: *Tetrahedron Lett.* 36, 2449 (1995a).
42. Lenz R., Zenk M. H.: *Eur. J. Biochem.* 233, 132 (1995b).

A. Balažová and M. Pšenák (*Department of Cellular and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Bio-synthesis of Morphinans: Enzymological and Molecular-Biological Aspects**

Morphinans form a subgroup of bezyliisoquinoline alkaloids. The carbon skeleton of these alkaloids is derived from two molecules of tyrosine. From a single tyrosine dopamine is formed by sequential action of tyrosine-dopa-decarboxylase and phenoloxidase. In opium poppy tyrosine-dopa-decarboxylase is encoded by a family of 10-14 genes. Amine oxidase has not been observed in opium poppy plants, i.e. tyramine is not an intermediate precursor of tyral, - *p*-hydroxyphenylacetaldehyde (aldehyde condensation unit). In poppy plants tyral is probably formed via decarboxylation of *p*-hydroxyphenylpyruvate. This can arise by transamination of the second molecule of tyrosine. By condensation of dopamine with tyral (*S*)-norcoclaurine is formed. This intermediate is transformed to (*S*)-reticuline. Dehydroreticuline is an intermediate in the conversion of (*S*)- to (*R*)-reticuline. The conversion of (*R*)-reticuline to salutaridine is a critical step in the biosynthesis of morphinan alkaloids. This reaction is catalysed by a specific P-450-enzyme system. Salutaridine is converted to salutaridine acetate by sequential action of NADPH-specific salutaridine reductase and acetyl-CoA-salutaridinol acetyltransferase. Salutaridinol acetate closes the oxide bridge and thebaine is formed. Codeinone is an intermediate in the conversion of thebaine to codeine and morphine. Oripavine is a natural constituent of poppy plants. Because codeinone/morphinone reductase catalyses the formation of codeine from codeinone and that of morphine from morphinone, it seems likely that morphine can be formed from thebaine via oripavine and morphinone. The enzymology of „demethylation“ in the conversion of thebaine to morphine has not been analysed as yet.