

Mikä tappoi Sokrateen?

Koniini myrkkyykatkossa ja muissa kasveissa

→ Hannu Hotti

MMT, Maataloustieteiden laitos, Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto, Suomi

Kirjeenvaihto:

hannu.hotti@helsinki.fi

Väitös Hannu Hotti, MMM, väitteli Helsingin yliopiston Maatalous-metsätieteiden tiedekunnasta 14.10.2016 aiheesta ”The killer of Socrates exposed – Coniine in the plant kingdom”. Vastaväittäjänä oli professori Heribert Warzecha Darmstadtin teknillisestä yliopistosta, Saksasta, ja kustoksena oli professori Teemu Teeri Helsingin yliopistosta

TIIVISTELMÄ

Sokrateen juomasta myrkkymaljan koostumuksesta on esitetty erilaisia teorioita. Yhden sen pääkomponenteista on arveltu olevan olleen myrkkyykatko (*Conium maculatum* L.). Siltä tunnetaan piperidiinialkaloideja koniini, joka on myös kahdellatoista aaloeajilla (*Aloe*) sekä keltatötterölehdellä (*Sarracenia flava* L.). Tuon alkaloidin biosynteesiä ei tunneta kunnolla toistaiseksi, mutta mahdollinen reitti alkaa polyketidillä, jonka on muodostanut polyketidisyntaasi (PKS). Tässä tutkimuksessa keskityttiin tunnistamaan ja karakterisoimaan myrkkyykatkolta pks-geenit, jotka voivat osallistuvat koniinin muodostukseen. Lisäksi tutkittiin koniinia ja sen kaltaisia alkaloideja sisältävillä kasveilla kalluksen muodostusta sekä mahdollisuutta elisitoida alkaloidituotanto kasvisoluviljelmissä, jotta koniinin biosynteesiä ymmärrettäisiin paremmin. Tutkimuksen eri vaiheissa käytetty kasvimateriaalin alkaloidikoostumus tutkittiin kaasukromatografiassa massaspektrometrillä. Tutkimuksen löytöihin kuuluu uudenlainen PKS, CPKS₅, joka aloittaa koniinin biosynteesin myrkkyykatkolla muodostamalla yhdisteen hiilirungon yhdestä butyryyli-CoA:sta ja kahdesta malonyyli-CoA:sta. Elisitoidut myrkkyykatkon ja aaloeiden soluviljelmät eivät tuottaneet piperidiinialkaloideja, mutta myrkkyykatkon elisitoidut solukkoviljelmät tuottivat furanokumariineja. Koniini on laajemmalle levinnyt tötterölehtien suvussa, kuin aikaisemmin on uskottu, ja aaloeista löytyi suvulle uusi piperidiinialkaloidi. Näiden tulosten yhteisvaikutuksena ymmärryksemme koniinin biosynteesin selvittämisessä on mennyt eteenpäin.

Avainsanat: alkaloidit, aaloe (*Aloe*), myrkkyykatko (*Conium maculatum*), koniini, polyketidi, polyketidisyntaasi, tötterölehti (*Sarracenia*), sekundäärimetabolia

Ydinasiat:

1. Myrkkycatkolta löydettiin koniinin biosynteesin aloittava polyketidisyntaasi, CPKS₅, joka tekee yhdisteen hiili rungon yhdestä butyryyli-CoA:sta ja kahdesta malonyyli-CoA:sta.
2. Myrkkycatkon ja myrkkyaaloeiden kalluksen elisitointi ei tuottanut piperidiinialkaloideja. Myrkkycatkolla elisitointi sai aikaiseksi furanokumariinien tuotannon ja myrkkyaaloeilla vahvasti antrakvinonien tuotantoa.
3. Keltatötterölehdeltä varmennettiin koniinin läsnäolo sekä seitsemältä muulta tötterölehdeltä löydettiin kyseinen alkaloidi herkän GC-MS-menetelmän ansiosta.

JOHDANTO

Sokrates tuomittiin kuolemaan vuonna 399 e.Kr. Syyksi on annettu Ateenan nuorison turmeleminen ja jumalanpilkka kaupungin perinteisiä jumalia kohtaan. Sokrateen kuolemantuomio pantiin täytäntöön siten, että hänen tuli juoda pharmakon-niminen myrkkymalja. Sokrateen kuolema on kuvattuna hänen oppilaansa Platonin teoksessa *Faidon*. Sen mukaan Sokrateen raajat menettivät ensin tunnon ja ajan kuluessa tunto katosi muualtakin. Sokrates pystyi puhumaan loppuun asti, ja dialogissa kuvataan hänen muiden kanssa käymään keskustelua. Sokrateen myrkkymaljan sisällöstä on käyty vuosien varrella paljon keskusteluja, ja myrkkycatkoa pidetään osana sen koostumusta. Eräs parhaimmista teorioista sen muusta sisällöstä on esittänyt de Boer (1950), ja hänen mukaansa malja sisälsi myrkkycatkon lisäksi oopiumia, viiniä ja mirhamia.

Alkaloidit ovat ryhmä kasviyhdisteitä, jotka ovat tyypillisesti farmakologisesti voimakkaasti vaikuttavia. Yksi tunnetuimmista piperidiinialkaloideista on koniini, joka tunnetaan parhaiten myrkkycatkolta (*Conium maculatum* L.) (Kuva 1A). Koniinin lisäksi myrkkycatkolta tunnetaan yksitoista muuta

piperidiinialkaloidia. Tuo yhdiste tunnetaan myös kahdeltatoista aaloelajilta (*Aloe*) (kuvat 1B-D) sekä lihansyökasvi keltatötterölehdeltä (*Sarracenia flava* L.) (kuva 1E). Koniini on merkittävä yhdiste kemian historiassa, sillä sen rakenne selvitettiin v. 1881 ja syntetisoitiin v. 1886 ensimmäisenä alkaloidina. Koniini on myrkyllinen yhdiste, jonka biosynteesiä ei kunnolla tunneta. Leete (1963 ja 1964) muodosti teorian, jonka mukaan koniinin hiilirunko koostuisi yhden asetyyli-CoA:n ja kolmen malonyyli-CoA:n muodostamasta poly-β-ketohaposta (eli polyketidistä). Tätä ajatusta tukevat Leeten (1963 ja 1964) tekemät radioaktiivisuuskokeiden tulokset, joissa leimatun asetaatin radioaktiiviset hiilet ovat jakautuneet tasaisesti parillisesti numeroitujen hiilten kesken. Kuvassa 2 on tiivistettynä ja koottuna tähän mennessä saatu tietämys koniinin kaltaisten alkaloidien biosynteesistä. Myöhemmin tutkimuksissa on todettu, että kasveilla polyketidejä tekevät polyketidisyntaasit (PKS) (esim. Eckermann ym., 1998).

Tutkimuksen tavoitteina olivat: 1) tunnistaa ja karakterisoida sellainen *pkS*-geeni, joka on mukana koniinin biosynteesissä, 2) saada aikaiseksi kal-

Kuva 1. Tutkimuksessa mukana olleet kasvit A myrkkycatko (*Conium maculatum*), B *Aloe gariensis*, C *A. globuligemma*, D *A. viguieri* ja E keltatötterölehti (*Sarracenia flava*).



luksen muodostuminen koniinin ja sen kaltaisia piperidiinialkaloideja sisältävillä kasveilla biosynteesitutkmuksiin, 3) käynnistää tai vahvistaa alkaloidituotantoa kasvisoluviljelmässä, 4) kehittää kasvatusmenetelmiä piperidiinialkaloideja sisältäville kasveille sekä 5) erilaisten kromatografisten menetelmien kehittäminen alkaloidien tutkimiseksi.

MENETELMÄT JA TULOKSET

Myrkkyykatkolta eristettiin pks-geenejä tai niiden paloja käyttämällä RACE-menetelmää (rapid amplification of cDNA ends) ja transkriptomianalyysiä (Hotti ym., 2015). Näillä menetelmillä saatiin kolme täyspitkää geeniä sekä fragmentteja kahdeksasta muusta mahdollisesta pks-geenistä. Fragmentteista ei voitu sanoa, kuuluivatko ne samalle geenille vai ei, sillä niillä ei ollut keskenään päällekkäin meneviä osia. Kun täyspitkiä CPKS₁:tä, 2:tä ja 5:tä tutkittiin aminohappotasolla, huomattiin CPKS₁:n ja 2:n olevan tavallisen kalkonisyntaasin kaltaisia entsyymejä, mutta CPKS₅:ssä oli muutoksia seitsemässä konservoituneessa aktiivisen kohdan aminohapossa. Nämä muutokset tekivät CPKS₅:stä varsin mielenkiintoisen, ja sen sekä CPKS₁:n ja 2:n tarkempi toiminta täytyi varmentaa *in vitro* -entsyymiaktiivisuuskokeilla. Entsyymit karakterisoiittiin tuottamalla ne ensin rekombinanttiproteiineina *Escherichia colissa*. Puhdistetuille entsyymeille annettiin substraatiksi erilaisia aloittaja-CoA:ta malonyyli-CoA:n kanssa koeputkessa ja muodostuneet lopputuotteet analysoitiin nestekromatografialla (taulukko 1). Näiden kokeiden perusteella kaksi kolmesta myrkkyykatkon pks-geenistä koodasi kalkonisyntaaseja (CPKS₁, CPKS₂), sillä ne aloittivat reaktionsa *p*-kumaryyli-CoA:lla, ja yksi uudenlainen PKS (CPKS₅). Kineettisesti CPKS₅ käytti parhaiten butyryyli-CoA:ta aloittaja-CoA:na koeolosuhteissa (kuva 3), kun vertailtiin erilaisten alifaattisten rasvahappojen kykyä toimia aloittajana. Näiden tulosten perusteella CPKS₅ aloittaa koniinin biosynteesin muodostamalla yhdisteen hiilirungon yhdestä butyryyli-CoA:sta ja kahdesta malonyyli-CoA:sta.

Työssä aloitettiin kallusviljelmiä myrkkyykatkosta ja kahdesta aaloelajista. Erilaisia elisiittoreita testattiin myrkkyykatkon soluviljelmässä, jotta voitaisiin selvittää mahdollisuutta koniinin tuottamiseen (Meier ym., 2015). Myrkkyykatkon kallus muodostui parhaiten Woody plant -alustalla, kun 6-bentsyymiaminopuriinia (BA) oli 0,188 mg/l

sekä 1-naftaleenietikkahappoa (NAA) oli 1, 2 tai 4 mg/l. Lopulta kallus siirrettiin alustalle, jossa hormonipitoisuudet olivat BA:ta 0,125 mg/l ja NAA:ta 3 mg/l. Elisitaatiokokeisiin valittiin vihreä, pehmeä ja nopeakasvuinen linja (kuva 4A), josta tehtiin nestekasvatus. Koniinituotantoa koetettiin elisitoida algiinihappolla, sellulaasientsyymillä, kitosaanilla, hopeanitraattilla, kupari(II)sulfaatilla, etyleenillä, salisyylihapolla ja metyylijasmonaattilla. Näistä metallisuolat, entsyymi sekä soluseinän komponentit saivat aikaiseksi furanokumariinin kertymisen viljelmiin. Uutteet sisälsivät bergapteenia, kolumbianetiinia, isopimpinelliiniä, marmesiinia, oroselonea, psoraleenia ja ksantoksiinia, mutta eivät yhtään piperidiinialkaloideja (Meier ym., 2015). Kasvihormonit (etylenei, metyylijasmonaatti ja salisyylihappo) eivät saaneet aikaiseksi furanokumariinituotantoa. Furanokumariinien suhteelliset määrät olivat yleisesti suuremmat kasvatusalustassa kuin soluissa.

Aloe gariepensis (kuva 4B) muodosti kallusta Murashige ja Skoog -alustalla (MS), kun kasvihormoneiden pitoisuudet olivat 10 mg/l NAA:ta ja 0,2 mg/l BA:ta (Hotti ym., 2016b). *A. viguieri* (kuva 4C) puolestaan muodosti kallusta samaisella alustalla hormonien ollessa 6 mg/l 2,4-(dikloorifenoksi) etikkahappo (2,4-D). Molempien lajien kallukset siirrettiin MS-alustalle, joka sisälsi 1 mg/l 2,4-D:tä niiden kasvaessa sillä paremmin kuin lähtöalustoilla. Kallukset itsessään eivät sisältäneet piperidiinialkaloideja ja niiden tuotantoa yritettiin elisitoida salisyylihapolla ja kitosaanilla. Elisitointi ei tuottanut alkaloideja, mutta tehosti antrakvinonien (antraseenijohdannaisten) tuotantoa (Hotti ym., 2016b). Ensimmäistä kertaa havaittiin aaloesuvulle krysarobinin tuotantoa. *A. viguierin* mikrolisäystä tutkittiin tietokoneavusteisella koeasettelulla ja jopa viisi hyvänlaatuista pikkukasvia saatiin muodostumaan yhdestä emokasvista, kun hormonipitoisuudet olivat MS-alustalla BA:ta 0,25 mg/l ja NAA:ta 0,4 mg/l. *In vitro* -kasvatetuista *A. gariepensikestä*, *A. globuligemmassa* ja *A. viguierista* löydettiin koniinia, γ -konikeiinia sekä uutena suvulle *N*-metyyli-koniinia.

Jotta tötterölehtilajeille tyypillinen matala koniinpitoisuus saataisiin tutkittua, kehitettiin herkkä kaasukromatografia-massaspektrometriaan (GC-MS) perustuva menetelmä, jolla havainnointiin kolmea koniinin irronnutta ionia (Hotti ym., 2016a). Tällä menetelmällä saavutettiin herkkyys, joka vas-

taa 1 µg koniinia/g kuivapainossa. Täten varmistettiin vuodelta 1976 Mody ym. raportti koniinista keltatötterölehdessä. Tämän lisäksi havaittiin koniini seuraavista lajeista: *S. alata*, *S. leucophylla*, *S. minor*, *S. oreophila*, *S. psittacina*, *S. purpurea* ja *S. rubra*.

TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä tutkimuksessa koniinin biosynteesiä tarkasteltiin usealla eri tasolla. Aikaisempien tutkimusten perusteella useita reitin avainentsyymejä tunnetaan (Roberts, 1971, 1974, 1975, 1977 ja 1985). Tähän asti on ollut kysymys siitä, kuinka myrkkyykatko muodostaa koniinin hiilirungon ja mistä nämä hiilet voisivat olla peräisin kasvilla. Tässä tutkimuksessa löydettiin koniinin hiilirungon tekevä entsyymi, CPKS5, joka valmistaa sen yhdestä butyryyli-CoA:sta ja kahdesta malonyyli-CoA:sta (kuva 5) (Hotti ym., 2015). Tosin tämän entsyymin todellinen rooli kasvilla täytyy varmentaa jatkotutkimuksella, mutta ensimmäistä kertaa on osoittaa entsyymiehdokas tähän toimintaan.

Myrkkyykatkon (Meier ym., 2015) ja kahden myrkkyykaalon (Hotti ym., 2016b) kallusviljelmät aloitettiin, jotta voitaisiin solukkoviljelmässä tutkia koniinin muodostusta. Myrkkyykatkolla kallus syntyi helposti hyvinkin erilaisissa olosuhteissa ja oli helppo ylläpitää. Aaloeiden kallukset eivät syntyneet kuin tietyissä olosuhteissa ja muodostuminen kesti toista kuukautta. Tässä väitöskirjassa testatut menetelmät eivät saaneet aikaiseksi piperidiinialkaloidien muodostusta solukkoviljelyssä kallussoluissa, mutta tästä on viitteitä, että ainakin myrkkyykatkolla koniinin biosynteesi vaatisi erilaistuneen solukon (Fairbairn ja Challen, 1959; Corsi ja Biasci, 1998). Aaloen versokasvatukset sisältävät piperidiinialkaloideja (Hotti ym.,

2016b), joten aaloen kohdalla on ilmeisesti samantapaiset vaatimukset kuin myrkkyykatkolla.

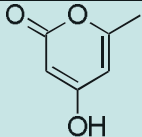
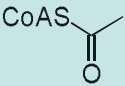
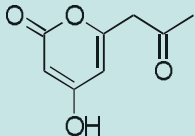
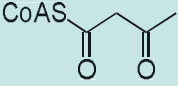
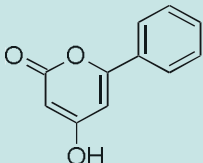
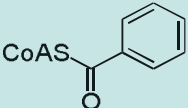
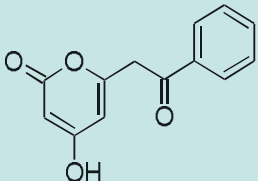
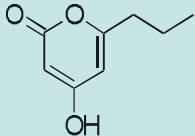
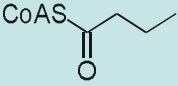
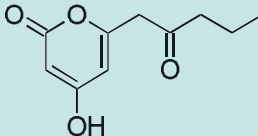
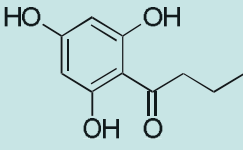
Tötterölehdillä olevan matalan koniinipitoisuuden (Mody ym., 1976) toteamiseksi kehitettiin herkkä GC-MS-menetelmä, jolla varmistettiin yhdisteen läsnäolo keltatötterölehdellä sekä seitsemällä muulla suvun lajilla (Hotti ym., 2016a). Kun kolmea myrkkyykaaloeta tutkittiin (Hotti ym., 2016b), löydettiin suvulle uusi alkaloidi, *N*-metyylikoniini, joka on aikaisemmin tunnettu ainoastaa myrkkyykatkolta. Lisäksi tutkittiin *A. viguierin* mikrolisäystä ja löydettiin hormonyhdistelmä, joka tuottaa viisi uutta kasvia yhtä emokasvia kohden. Se huomattiin, että samainen aaloe kärsii herkästi liiasta vesittymisestä (eng. hyperhydration), jos hormoneiden pitoisuuksien ovat liian korkeat.

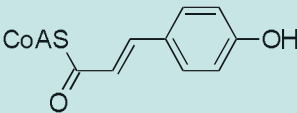
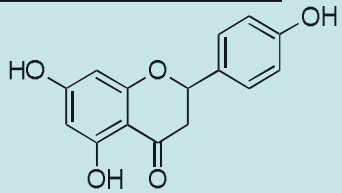
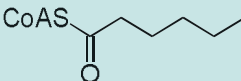
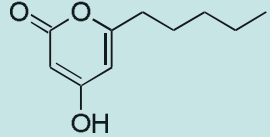
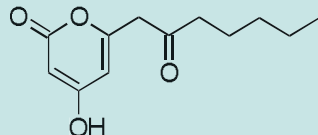
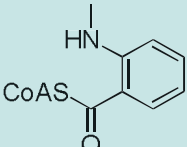
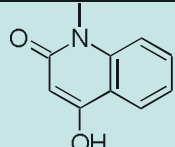
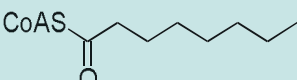
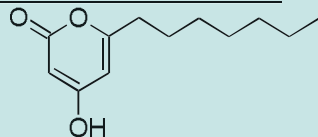
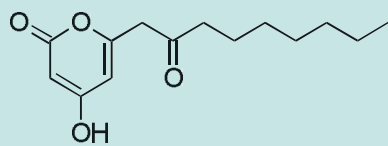
Näiden tulosten yhteisvaikutuksena ymmärrysemme koniinin biosynteesin selvittämisessä on mennyt eteenpäin. Nämä alkaloidit ovat levinneet laajemmalle kuin aikaisemmin on tiedetty. Erilaiset *in vitro* -menetelmät, kuten kalluksen tutkiminen, ovat arvokkaita, kun tutkitaan koniinin biosynteesireittiä. Tuon reitin ensimmäisen entsyymin, CPKS5:n, löytäminen auttaa tunnistamaan reitin muut entsyymit myrkkyykatkon eri osien sekvensoidusta transkriptomeista, sillä muiden reitin entsyymien tulee olla aktiivisia samoissa solukoissa kuin CPKS5:n. Lisäksi sekvensoinnin hinnan ollessa tullut alas viime vuosien aikana mahdollistaa transkriptomien vertailun myrkkyykatkon, myrkkyykaaloiden ja tötterölehtien kesken, jotta voidaan selvittää koniinin biosynteesin eroja ja samankaltaisuuksia näiden kasvien välillä. Tämä tutkimus mahdollistaa myöhemmin muokatun koniinin uudelleen tuomisen lääkkeenä, jona se katosi 1900-luvun alussa, koska koniinin terapeuttiset määrät olivat liian lähellä myrkkylisiä määriä.

Kuva 4. A Myrkkyykatkon (*Conium maculatum*) kallus, B *Aloe gariepensiksen* kallus ja C *A. viguierin* kallus.

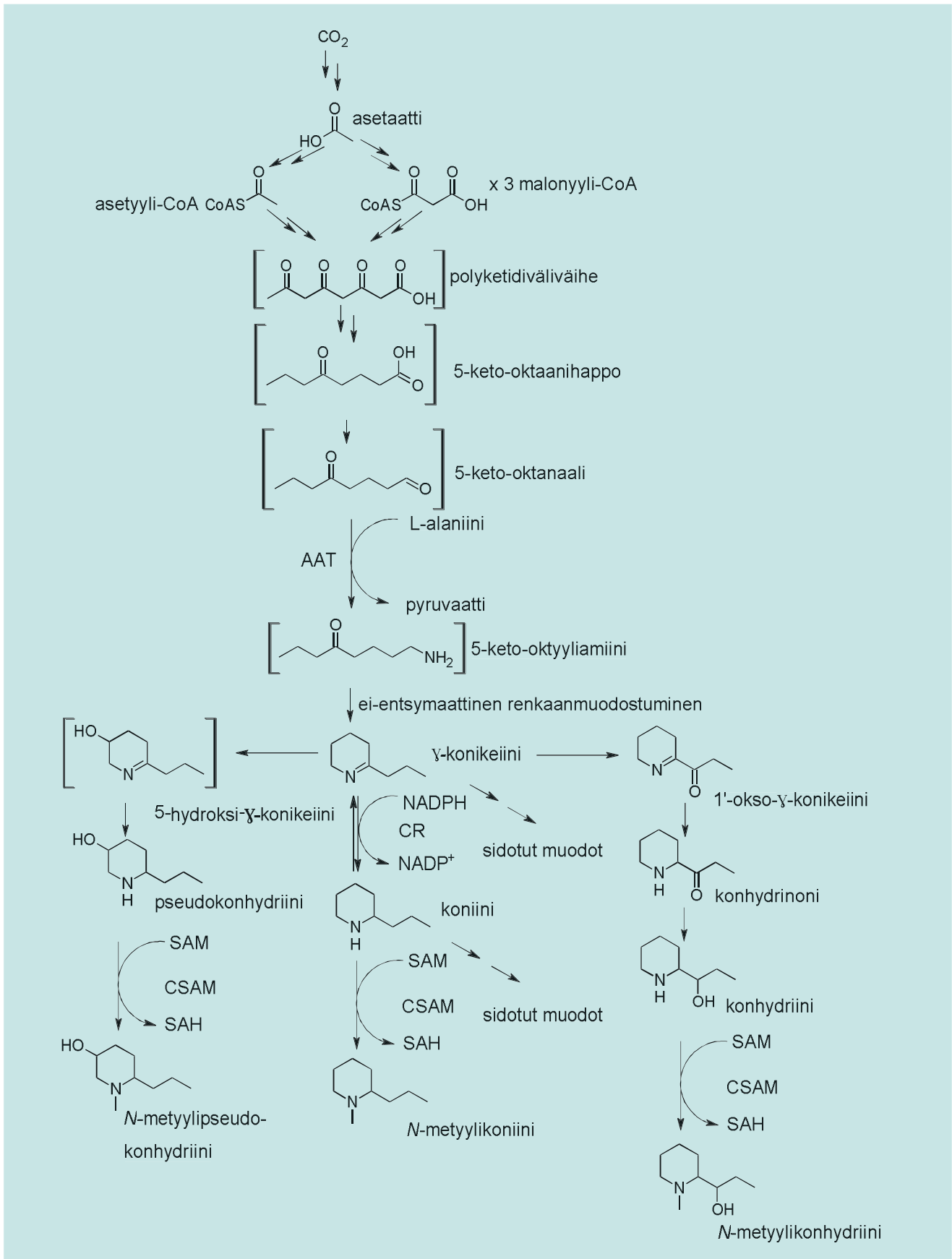


Taulukko 1. Myrkkukatkon CPKS5:n *in vitro*-reaktiotuotteet eri substraateilla. Rakenteet, retentioajat ja UV-absorbanssi määritettiin UPLC-MS-menetelmällä (Hotti ym., 2015).

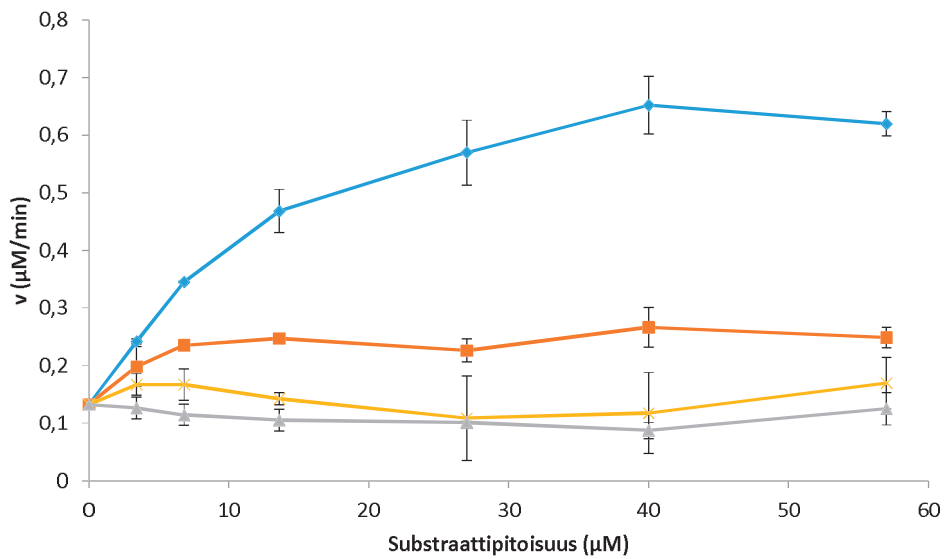
| Aloittaja-CoA | Polyketidiaste | Tuote | IUPAC-nimi | Rt (min) | λ_{\max} (nm) | m/z [M-H] ⁻ | Tuotteen rakenne |
|---|----------------|-------|--|----------|-----------------------|--------------------------|---|
| Asetyyli-/Asetoasetyyli-CoA | Triketidi | A3 | 4-Hydroksi-6-2H-pyran-2-oni | 2.16 | 283 | 125 |  |
|  | Tetraketidi | A4 | 4-Hydroksi-6-(2-oksopropyyli)-2H-pyran-2-oni | 1.78 | 282 | 167 |  |
|  | Triketidi | Be3 | 4-Hydroksi-6-fenyyli-2H-pyran-2-oni | 4.31 | 283 | 187 |  |
|  | Tetraketidi | Be4 | 4-Hydroksi-6-(2-okso-2-fenyylietyyli)-2H-pyran-2-oni | 4.13 | 319 | 229 |  |
| Butyryyli-CoA | Triketidi | Bu3 | 4-Hydroksi-6-propyyli-2H-pyran-2-oni | 3.77 | 284 | 153 |  |
|  | Tetraketidi | Bu4a | 4-Hydroksi-6-(2-okso-2-pentyyli)-2H-pyran-2-oni | 3.59 | 284 | 195 |  |
| | Tetraketidi | Bu4b | 1-(2,4,6-Trihydroksifenyyli)butan-1-oni | 4.89 | 225, 284, 284.7 | 195 |  |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|----|---|----------|-------------------------|-----------------|---|---|
| <i>p</i> -Kumaryyli-CoA | Tetraketi di | C4 | 5,7-Dihydroksi-2-(4-hydroksifenyyli)-2,3-dihydro-4 <i>H</i> -kromen-4-oni | 4.6 6 | 289 | 271 |  |  |
| Heksanoyyli-CoA | Triketidi | H3 | 4-Hydroksi-6-pentyyli-2 <i>H</i> -pyran-2-oni | 5.0 2 | 284 | 181 |  |  |
| | Tetraketi di | H4 | 4-Hydroksi-6-(2-oksoheptyyli)-2 <i>H</i> -pyran-2-oni | 4.8 7 | 284 | 223 |  | |
| <i>N</i> -Metyliantraniloyyli-CoA | Diketidi | N2 | 4-Hydroksi-1-methyylikvino lin-2(1 <i>H</i>)-oni | 3.8 4 | 228 , | 174 274 , |  |  |
| Oktanoyyli-CoA | Triketidi | O3 | 6-Heptyyli-4-hydroksi-2 <i>H</i> -pyran-2-oni | 6.1 4 | 225 .7, 284 .7 | 209 |  |  |
| | Tetraketi di | O4 | 4-Hydroksi-6-(2-oksononyyli)-2 <i>H</i> -pyran-2-oni | 5.9 2 | 225 .7, 283 .2 | 251 |  | |

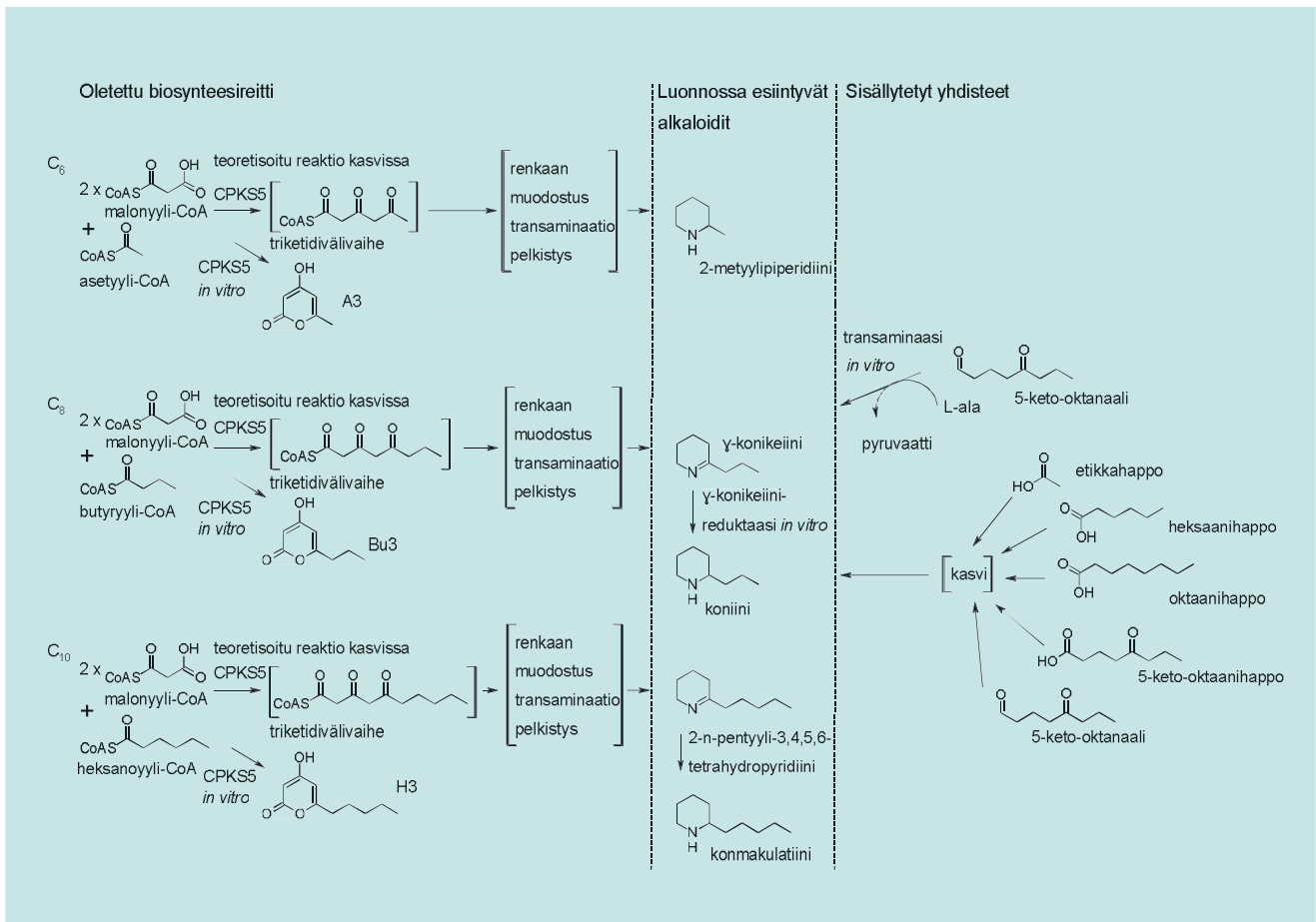
Kuva 2. Koniinin biosynteesireitti Fairbairnin & Challenin (1959), Leeten (1963 & 1964), Leeten & Adityachudhurn (1967), Dietrichin & Martinin (1968 & 1969), Fairbairnin & Alin (1968), Leeten & Olsonin (1970 & 1972) ja Robertsin (1971, 1974, 1975, 1977 & 1985) mukaan. Lyhenteet: AAT L-alaniini:5-keto-oktanaaliaminotransferaasi, CSAM S-adenosyyli-L-metioniini:koniinimetyylitransferaasi, CR γ -konikeiiniireduktaasi.



Kuva 3. Myrkkyykatkon CPKS5:n entsymaattinen testaus (Hotti ym., 2015). CPKS5:lle syötettiin butyryyli-CoA (sininen), heksanoyyli-CoA (oranssi), oktanoyyli-CoA (keltainen) ja asetyyli-CoA (harmaa) yhdessä malonyyli-CoA:n (200 μM) kanssa.



Kuva 5. Ehdotettu koniiniin johtava biosynteesireitti myrkkyykatkolla. Keskellä olevat C_6 -, C_8 - ja C_{10} -alkaloidit on eristetty myrkkyykatkosta. Mahdolliset CPKS5:n kondensaatioreaktioiden tuotteet on näytetty yhdessä niiden vastaavien *in vitro*-tuotteiden kanssa vasemmalla. Oikealla ovat myrkkyykatkolla aikaisemmin ulkoisesti syötetyt yhdisteet, joiden leimatut hiilet ovat olleet sisällytettynä koniiniin, ja aikaisemmin raportoidut reaktiot (Hotti ym., 2015). Yhdisteiden A3, Bu3 ja H3 tiedot ovat taulukossa 1.



What killed Socrates?

Coniine in poison hemlock and other plants

The Academic dissertation of Hannu Hotti, M.Sc. (Agr. & For.), on “The killer of Socrates exposed – Coniine in the plant kingdom” was presented in the Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki on 14th October, 2016. Professor Heribert Warzecha, the Technische Universität Darmstadt, served as the opponent, and Professor Teemu Teeri, University of Helsinki, Finland, as the custos

ABSTRACT

Coniine, a piperidine alkaloid, is known from poison hemlock (*Conium maculatum* L.), twelve *Aloe* species and *Sarracenia flava* L. Its biosynthesis is not well understood, although a possible route starts with a polyketide formed by a polyketide synthase (PKS). This study focused on identification and characterization of *pks*-genes involved in coniine formation, induction of callus from plants containing hemlock alkaloids and investigation of the possibility to elicitate the alkaloid pathway in cell culture in order to understand coniine biosynthesis. Plant materials involved in different stages of this study were investigated for their alkaloid content using gas chromatography-mass spectrometry. A novel type of PKS, CPKS₅, was identified as the starter candidate for the initiation of coniine biosynthesis by catalysing the synthesis of the carbon backbone from one butyryl-CoA and two malonyl-CoA moieties. When elicited, poison hemlock cell cultures were shown to produce furanocoumarins but no piperidine alkaloids. It has been shown that the hemlock alkaloids are wider distributed than previously has been thought among *Sarracenia*, and *Aloe* spp. was shown to contain a new alkaloid for the genus. These results together pave the way towards possible utilization of hemlock alkaloids for example in medication for nerve pain.

Keywords: alkaloids, aloe (*Aloe*), coniine, pitcher plant (*Sarracenia*), poison hemlock (*Conium*), polyketide, polyketide synthase, secondary metabolism

KIRJALLISUUS

- de Boer J: 1950. The death of Socrates. A historical and experimental study on the actions of coniine and **Conium maculatum**. Arch Int Pharmacodyn Ther 83: 473-490, 1950
- Corsi G, Biasci D: Secretory structures and localization of alkaloids in **Conium maculatum** L. (Apiaceae). Ann Bot 8: 157-162, 1998
- Dietrich SMC, Martin RO: Biosynthesis of **Conium** alkaloids using carbon-¹⁴ dioxide. Interrelation of γ -coniceine, coniine, and N-methylconiine. J Am Chem Soc 90: 1921-1923, 1968
- Dietrich SMC, Martin RO: The biosynthesis of Conium alkaloids using carbon-14 dioxide. The kinetics of ¹⁴C incorporation into the known alkaloids and some new alkaloids. Biochemistry 8: 4163-4172, 1969
- Eckermann S, Schröder G, Schmidt J, Strack D, Edrada RA, Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, Kilpeläinen I, Proksch P, Teeri TH, Schröder J: New pathway to polyketides in plants. Nature 396: 387-390, 1998
- Fairbairn JW, Ali AAER: The alkaloids of hemlock (**Conium maculatum** L.) – III. The presence of bound forms in the plant. Phytochemistry 7: 1593-1597, 1968
- Fairbairn JW, Challen SB: The alkaloids of hemlock (**Conium maculatum** L.). Distribution in relation to the development of the fruit. Biochem J 72: 556-561, 1959
- Hotti H, Seppänen-Laakso T, Arvas M, Teeri TH, Rischer H: Polyketide synthases from poison hemlock (**Conium maculatum** L.). FEBS J 282: 4141-4156, 2015
- Hotti H, Gopalacharyulu P, Seppänen-Laakso T, Rischer H: Metabolite profiling of the carnivorous pitcher plants **Darlingtonia** and **Sarracenia**. Submitted to PLoS ONE, 2016a
- Hotti H, Häkkinen ST, Seppänen-Laakso T, Rischer H: Polyketides in **Aloe** plant and cell cultures. Manuscript, 2016b.
- Leete E: The Biosynthesis of coniine four acetate units. J Am Chem Soc 85: 3523-3524, 1963
- Leete E: Biosynthesis of the hemlock alkaloids. The incorporation of the acetate-¹⁴C into coniine and conhydrine. J Am Chem Soc 86: 2509-2513, 1964
- Leete E, Adityachaudhury N: Biosynthesis of the hemlock alkaloids – II. The conversion of γ -coniceine to coniine and Ψ -conhydrine. Phytochemistry 6: 219-223, 1967
- Leete E, Olson JO: 5-Oxo-octanoic acid and 5-oxo-octanal, precursors of coniine. J Chem Soc, Chem Commun 23: 1651-1652, 1970
- Leete E, Olson JO: Biosynthesis and metabolism of the hemlock alkaloids. J Am Chem Soc 94: 5472-5477, 1972
- Meier P, Hotti H, Rischer H: Elicitation of furanocoumarins in poison hemlock (**Conium maculatum** L.) cell culture. Plant Cell Tissue Organ Cult 123: 443-453, 2015
- Mody NV, Henson R, Hedin PA, Kokpol U, Miles DH: Isolation of insect paralyzing agent coniine from **Sarracenia flava**. Experientia 32: 829-830, 1976
- Roberts MF: The formation of γ -coniceine from 5-ketooctanal by a transaminase of **Conium maculatum**. Phytochemistry 10: 3057-3060, 1971
- Roberts MF: An S-adenosyl-L-methionine; coniine methyltransferase from **Conium maculatum**. Phytochemistry 13: 1847-1851, 1974
- Roberts MF: γ -Coniceine reductase in **Conium maculatum**. Phytochemistry 14: 2393-2397, 1975
- Roberts MF: Purification and properties of L-alanine:5-ketooctanal aminotransferase from **Conium maculatum**. Phytochemistry 16: 1381-1386, 1977
- Roberts MF: Enzymatic synthesis of γ -coniceine in **Conium maculatum** chloroplasts and mitochondria. Plant Cell Rep 1: 10-13, 1981
- Roberts MF: Alkaloid production in **Conium** fruit. J Pharm Pharmacol 37: 141P, 1985