



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

206 950

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 18 09 79
(21) PV 6286-79

(51) Int. Cl.¹ C 12 P 19/40

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 01 11 83

(75)

Autor vynálezu NEJEDLÝ ZDENĚK ing., FILIP JIŘÍ ing. CSc., PEČ VLADIMÍR a KOLINA JOSEF ing. CSc.,
PRAHA

- (54) Způsob enzymové syntézy radioaktivního adenosinu, značeného specificky či nespecificky radioizotopem ^{14}C nebo ^3H

Předmětem vynálezu je způsob enzymové syntézy radioaktivního adenosinu, značeného radioizotopem ^{14}C nebo ^3H specificky či nespecificky, využívající katalytických vlastností nepurifikovaných supernatantních frakcí homogenátů bakterií *Escherichia coli* B (frakce 105.000 x g). Enzymy přítomné v nepurifikovaných supernatantních frakcích katalyzují přenos ribosylové skupiny mezi radioaktivním či neradioaktivním adeninem a Δ -D-ribose-1-fosfátem, respektive radioaktivními či neradioaktivními ribonukleosidy.

Způsobem dle předmětného vynálezu lze připravit radioaktivní adenosin značený radioizotopem ^{14}C respektive ^3H specificky či nespecificky, dále provést jeho značení alternativně buď v bázi nebo ribosylovém zbytku, případně nespecificky v celé molekule; kromě toho se umožňuje kombinované značení adenosinu oběma shora uvedenými radioizotopy.

Způsob enzymové syntézy radioaktivního adenosinu dle předmětného vynálezu využívá specifického složení enzymů katalyzujícího enzymového preparátu a jeho široké substrátové specifity, která dovoluje aplikovat různé donory ribosylových skupin, například radioaktivního či neradioaktivního Δ -D-ribose-1-fosfátu, guanosinu, inosinu, cytidinu či uridinu.

Při enzymové syntéze radioaktivního adenosinu způsobem dle předmětného vynálezu se neprojevuje vliv degradativních enzymů; nežádoucí adenosindeaminázová aktivita

208 950

v enzymových preparátech se eliminuje primárně způsobem přípravy supernatantních frakcí bakteriálních homogenátů, případně sekundárně parciální termickou inaktivací.

Reakční podmínky enzymové syntézy radioaktivního adenosinu způsobem dle předmětného vynálezu lze zvolit tak, že stupeň konverze radioaktivního adeninu na adenosin zpravidla převyšuje 90 %.

Studium biologické funkce nukleových kyselin v živých organismech, zkoumání chemické struktury těchto polymerů a cest jejich vzniku v živé buňce je stále středem zájmu řady vědních disciplín. Neocenitelnou pomocí pro všechny oblasti výzkumu nukleových kyselin je aplikace jejich základních složek značených vhodným radioizotopem. K metodicky nejvýznamnějším složkám nukleových kyselin patří nukleosidy a nukleotidy adeninu. Účinné způsoby značení těchto sloučenin radioaktivními izotopy jsou proto záležitostí vysoce aktuální a jsou trvale sledovány.

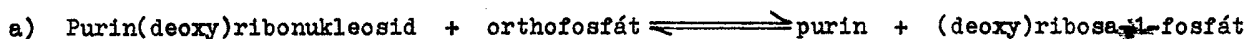
Stávající způsoby přípravy radioaktivního adenosinu vycházejí z obecně známých metodických možností organické syntézy a biosyntézy. Adenosin se zpravidla připravuje značený radioizotopem ^{14}C nebo ^3H nespecificky v celé molekule nebo specificky v purinové bázi.

Pro řešení řady specifických problémů biosyntézy nukleových kyselin je však žádoucí mít k dispozici i radioaktivní adenosin značený alternativně buď v purinové bázi nebo ribosylovém zbytku, a to specificky i nespecificky; v úvahu připadá i kombinovaný způsob značení, například radioizotopem ^{14}C v purinové bázi a radioizotopem ^3H v ribosylu. Způsob dle předmětného vynálezu představuje universální model enzymové syntézy radioaktivního adenosinu, který výše zmíněné způsoby jeho značení umožňuje. Svou podstatou je předmětný způsob přípravy radioaktivního adenosinu specifickým případem přenosu ribosylových skupin mezi purinovou bázi a purinovými či pyrimidinovými nukleosidy, katalyzovaného enzymy ze skupiny glykosyltransferas.

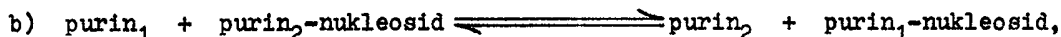
Zatímco o existenci přímého přenosu deoxyribosylových skupin mezi bázemi a deoxyribonukleosidy reakcemi "transferázového" typu se u některých druhů bakterií, například sp. *Lactobacillus*, se nepochybuje (McNutt, W. S., J. Biochem. 50, 384 /1952/; Beck, W. S. a Levin, M., J. Biol. Chem. 238, 702 /1963/) a u dalších druhů bakterií, například sp. *Escherichia coli*, se tento způsob přenosu deoxyribosylových skupin alespoň předpokládá (Hoffmann, C. E., Federation Proc. 11, 231 /1952/), nebyly pro existenci "transferázového" typu přenosu ribosylových skupin u bakterií dosud shromážděny přesvědčivé důkazy. Pouze Koch (Koch, A. L., J. Biol. Chem. 223, 535/1956/), který zkoumal mechanismus štěpení inosinu a guanosinu enzymy přítomnými v nepurifikovaných bezbuněčných extraktech bakterií *Escherichia coli* B v přítomnosti potenciálních inhibitorů či stimulatorů reakce (mimo jiné purinových a pyrimidinových bází), usoudil na přítomnost specifických nukleosidribosyltransferas zprostředkovávajících přenos ribosylových skupin mezi ribonukleosidy a bázemi. Tyto bezesporu zajímavé závěry však nejsou dokumentovány v potřebné míře experimentálními nálezy; za pozoru-

hodné však lze považovat zjištění, že bezbuněčné bakteriální extrakty obsahují významné množství adenosindeaminázy, což znemožňuje aplikovat adenosin jako substrát.

Ve srovnání s nukleosidribosyltransferázami jsou informace o bakteriálních nukleosidfosforylázách rozsáhlé. To se týká zejména purin-nukleosidfosforylázy; o výskytu tohoto enzymu v živočišných i bakteriálních tkáních, jeho specifických katalytických vlastnostech i mechanismu jím katalyzovaných enzymových reakcí, se poznatky zveřejňují čas od času přehledně (Friedkin, M. a Kalckar, H. v "The Enzymes", 2. vyd. /Boyer, P. D., Lardy, H. a Myrback, K., editors/ sv. 5, str. 237 /1961/ - Acad. Press, New York; Parks, R. E. Jr. a Agarwal, R. P. v "The Enzymes" /Boyer, P. D., editor/ sv. 7, str. 483 /1972/ - Acad. Press, New York). Purin-nukleosidfosforylázy z bakterií *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* byly dokonce připraveny v krystalické formě jako elektroforeticky homogenní preparáty (Jensen, K. F. a Nygaard, P., Eur. J. Biochem. 51, 253 /1975/; Jensen, K. F., Eur. J. Biochem. 61, 377 /1976/). Tyto vysoce purifikované enzymy jsou makromolekuly o molekulové hmotnosti $138.000 \pm 10\%$ sestávající ze šesti podjednotek, přičemž jejich hexametrická forma je enzymově aktivní. S oběma enzymy byly provedeny rozsáhlé kinetické studie reakcí mezi purinovými bázemi a nukleosidy. Soudí se, že enzymy katalyzují dva typy reakcí:



a

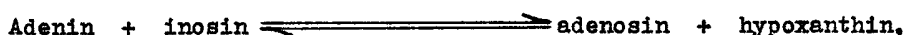


přičemž purinovou složkou je adenin, guanin či hypoxanthin.

Nejen reakce typu a), ale i reakce typu b) vyžaduje přítomnost anorganického fosfátu, a to alespoň v katalytickém množství; přitom neexistují žádné okolnosti, které by mechanismus této reakce "transferázového" typu mohly vysvětlit jinak než na podkladě sekvenčního působení fosforolýzy a syntézy nukleosidů.

Ve většině studií zabývajících se řešením mechanismu přenosu ribosylových skupin mezi bázemi a ribonukleosidy se ovšem aplikují nukleosidfosforylázy nikoli ve formě homogenních enzymů o definované molekulové hmotnosti, ale buď ve formě nepurifikovaných bakteriálních extraktů nebo ve formě enzymových preparátů o různém stupni purifikace.

Mechanismus přenosu ribosylových skupin reakcí typu "purin-purin" katalytickým účinem enzymů přítomných v bezbuněčných extraktech bakterií *Escherichia coli* B byl modelově studován na reakci:



a to v prostředí fosfátového pufru při fyziologické teplotě (Ott, J. L. a Werkman, C. H., Arch. Biochem. Biophys. 48, 483 /1954/; Ott, J. L. a Werkman, C. H., Arch. Biochem. Biophys. 69, 264 /1957/; Ott, J. L. a Werkman, C. H., Biochem. J. 65, 609 /1957/; Ott, J. L. a Werkman, C. H., v "Biochemistry of Nitrogen", Ann. Acad. Scient. Fennicae A. II. 60, 174 /1955/). Zjistilo se, že bakterie *Escherichia coli* B obsahují

208 950

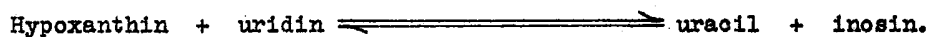
purin-nukleosidfosforylázy, které jsou aktivní vůči adenosinu a inosinu, a že tyto enzymy mohou katalyzovat přenos ribosylové skupiny mezi adeninem a inosinem za tvorby α -D-ribosa-1-fosfátu jako meziprojektu ve dvoustupňové reakci:

- a) Inosin + orthofosfát $\rightleftharpoons$ hypoxanthin + α -D-ribosa-1-fosfát, a
 b) adenin + α -D-ribosa-1-fosfát $\rightleftharpoons$ adenosin + orthofosfát

Bezbuňčné extrakty byly aplikovány v nepurifikované formě, bez dialýzy nebo dialyzované, v některých případech po parciální purifikaci nasyceným roztokem síranu amonného. K zásadním zjištěním patří poznatek, že bezbuňčné extrakty obsahují enzymový systém, který katalyzuje jednak syntézu adenosinu z adeninu a inosinu, jednak deaminaci vzniklého adenosinu na inosin. Uvádí se však pH prostředí optimální pro syntézu adenosinu (pH = 6,5), při kterém zároveň stupeň deaminace adenosinu je minimální. Zjišťuje se, že orthofosfát se v mechanismu shora uvedených reakcí uplatňuje již v katalytickém množství. Poukazuje se na inhibiční účín dvojmocných kationtů, konstatuje se však, že přítomností fosfátových iontů se tento inhibiční účín ruší.

Obecný model mechanismu přenosu ribosylových skupin typu "purin-purin" byl vypracován na základě výsledků získaných aplikací vysoce purifikované purin-nukleosidfosforylázy z bakterií *Aerobacter cloacae* (Tazuke, Y. a Yamada, H., Agr. Biol. Chem. 27, 625 /1963/); preparát vykazuje vysokou katalytickou aktivitu vůči adenosinu, guanosinu a inosinu a katalyzuje vzájemný přenos ribosylu mezi purinovými bázemi a nukleosidy, avšak je zcela inaktivní vůči uridinu a cytidinu.

Přenos ribosylu typu "purin-pyrimidin" byl detailně studován pomocí nukleosidfosforyláz izolovaných z bakterií *Erwinia carotovora* a *Corynebacterium sepeidonicum*, které byly vybrány z širokého souboru testovaných bakteriálních kultur vykazujících nukleosidfosforyláзовou aktivitu (Sakai, T., Tochikura, T. a Ogata, K., Agr. Biol. Chem. 29, 742 (1965/; Sakai, T., Tochikura, T. a Ogata, K., Agr. Biol. Chem. 30, 245 /1966/). Aplikovány byly jednak bezbuňčné extrakty bakterií, jednak vysoce purifikované enzymy. Modelově byla studována reakce:



Byl učiněn závěr, že reakce probíhá ve dvou stupních:

- a) Uridin + orthofosfát $\rightleftharpoons$ uracil + α -D-ribosa-1-fosfát, a
 b) hypoxanthin + α -D-ribosa-1-fosfát $\rightleftharpoons$ inosin + orthofosfát

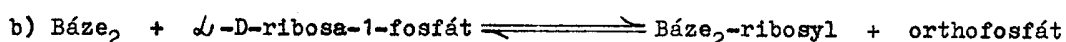
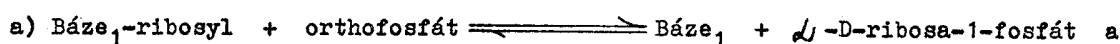
a je katalyzována kombinovaným účínem pyrimidin-nukleosidfosforylázy (reakce a/) a purin-nukleosidfosforylázy (reakce b/). Reakce probíhá dobře v prostředí fosfátového pufru, je reversibilní a její rovnováha je zřetelně posunuta ve směru tvorby purinového nukleosidu. Průběh reakce je podmíněn přítomností orthofosfátu a optimální syntéza inosinu je závislá na pH prostředí. Jako purinové substráty mohou fungovat adenin a hypoxanthin. Bezbuňčné bakteriální extrakty obsahují výrazné

množství adenosindeaminázy; v případě, že je akceptorem ribosylu adenin, získá se shora uvedenou reakcí směs adenosinu a inosinu. Adenosindeaminázu lze z dialyzovaných bezbuněčných extraktů bakterií *Erwinia carotovora* v podstatné míře odstranit srážením kyselinou octovou. Vzhledem k vysokému obsahu cytidindeaminázy v nepurifikovaných bakteriálních extraktech není cytidin jako donor ribosylu funkční.

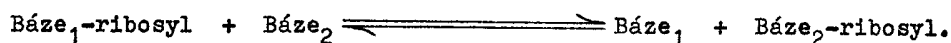
Výčet shora uvedených informací, týkajících se možnosti enzymového přenosu ribosylu mezi bázemi nukleových kyselin a nukleosidy v bakteriálních kulturách, lze shrnout následovně.

Přenos ribosylových skupin mezi ribonukleosidy a volnými bázemi, včetně přenosu ribosylové skupiny z ribonukleosidů na adenin, je u bakterií často se vyskytujícíím typem enzymové přeměny. Mechanismus enzymových přeměn je zevrubně prozkoumán; z četných studií vyplývá, že přenos ribosylu se uskutečňuje dvěma typy reakcí:

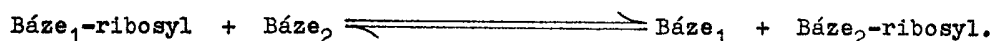
- 1) Reakcí, která se zpravidla označuje jako typ "fosforylázový" a která probíhá ve dvou stupních:



Souhrnně:



- 2) Reakcí, kterou lze označit jako typ "transferázový" a která probíhá v jediném stupni:



Prvý typ reakce je katalyzován nukleosidfosforylázami, a sice purin-nukleosidfosforylázou [E.C.2.4.2.1., Purin-nukleosid: orthofosfátribosyltransferasa] resp. pyrimidin-nukleosidfosforylázou [E.C.2.4.2.2., Pyrimidin-nukleosid: orthofosfátribosyltransferáza]. Reakce druhého typu je katalyzována nukleosidribosyltransferázou [E.C.2.4.2.5., Nukleosid: purin(pyrimidin)ribosyltransferáza].

Specifická katalytická účinnost shora uvedených enzymů není beze zbytku vyjasněna, takže není možno s určitostí tvrdit, který reakční typ je určující, či do jaké míry se oba reakční mechanismy uplatňují komplementárně. Zatím se většinou soudí, že převládá "fosforylázový" typ reakce, tedy dvoustupňový přenos ribosylové skupiny, případně se katalytická účinnost nukleosidfosforyláz rozšiřuje i na sféru reakcí "transferázového" typu.

Předmětný vynález uvádí nový způsob enzymové syntézy radioaktivního adenosinu. Základem postupu je využití katalytických vlastností enzymů přítomných v supernatantních frakcích homogenátů bakterií *Escherichia coli* B, získaných odstředěním bakteriálních suspenzí při 105.000 x g a aplikovaných jako nepurifikovaný enzymový preparát.

208 950

Bakterie *Escherichia coli* B se kultivují libovolným vhodným způsobem, nejlépe v čistě syntetickém mediu obsahujícím glukózu (Škoda J., Hess V. F. a Šorm F., Coll. Czech. Chem. Commun. 22, 1130 /1957/); živný roztok se inokuluje 2 % kultury *Escherichia coli* B staré 24 hod., kultivace bakterií se provede stacionárně při teplotě 310 K a přerušší se v okamžiku končící exponenciální fáze růstu kultury. Bakterie se promyjí při 277 K fyziologickým roztokem a pak se suspendují v ledovém 0,05 M Tris-HCl pufru o pH 7,4. Bakteriální suspenze se homogenizují dezintegrací ultrazvukem při 275 až 277 K. Optimální doba a intenzita dezintegrace se určí s ohledem na hustotu bakteriálních suspenzí; zpravidla se bakterie získané kultivací po dobu 16 hodin suspendují ve 40 ml pufru a homogenizují ultrazvukem při výkonu dezintegrátoru 1,5 kc po dobu 70 sekund. Supernatantní frakce homogenátů, které se aplikují jako nepurifikované enzymové preparáty, se v menších porcích skladují při 253 K. Před vlastní aplikací se v enzymových preparátech zjišťuje přítomnost adenosindeaminázy. Enzymové preparáty, připravené shora uvedeným postupem, adenosindeaminázovou aktivitu zpravidla neobsahují. Případná residuální množství adenosindeaminázy v preparátech se odstraní její parciální termickou denaturací; k tomuto účelu dostačuje několikanásobné rozmrazení preparátu na laboratorní teplotu, případně preinkubace preparátu v prostředí 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 8, při teplotě 310 K a po dobu 1 hod.

Postup přípravy radioaktivního adenosinu dle předmětného vynálezu se provádí tak, že se adenosin získá značený specificky či nespecificky v bázi radioizotopem ^{14}C respektive ^3H , dále značený alternativně buď v bázi nebo ribosylu, případně značený nespecificky v celé molekule nebo kombinovaně oběma zmíněnými radioizotopy.

Princip enzymové syntézy radioaktivního adenosinu spočívá v "ribosylaci" neradioaktivního či radioaktivního adeninu (značeného radioizotopem ^{14}C respektive ^3H specificky či nespecificky) katalytickým účinem enzymů přítomných v supernatantních frakcích homogenátů bakterií *Escherichia coli* B získaných odstředěním bakteriálních suspenzí při 105.000 x g, v přítomnosti donorů ribosylových skupin, s výhodou β -D-ribosa-1-fosfátu respektive neradioaktivních či radioaktivních ribonukleosidů (značených radioizotopy ^{14}C respektive ^3H), při reakční teplotě v rozmezí 276 až 310 K a v rozmezí vhodného pufru, s výhodou Tris-HCl pufru o pH 6,5 až 7,5.

Postup přípravy radioaktivního adenosinu dle předmětného vynálezu využívá k produkci této sloučeniny následujících hlavních kombinací akceptorů a donorů ribosylových skupin:

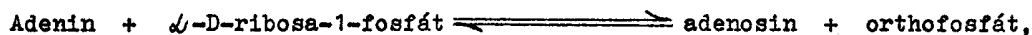
	Akceptor:	Donor:	Produkt:
1.	Adenin ⁺	β -D-ribosa-1-fosfát	[adenin ⁺]Adenosin
2.	Adenin ⁺	(Purin)ribonukleosid	[adenin ⁺]Adenosin
3.	Adenin ⁺	(Pyrimidin)ribonukleosid	[adenin ⁺]Adenosin
4.	Adenin ⁺	(Purin)ribonukleosid ⁺	Adenosin ⁺
5.	Adenin ⁺	(Pyrimidin)ribonukleosid ⁺	Adenosin ⁺
6.	Adenin	(Purin)ribonukleosid ⁺	[ribosa ⁺]Adenosin

7. Adenin (Pyrimidin)ribonukleosid⁺ [ribose⁺]Adenosin

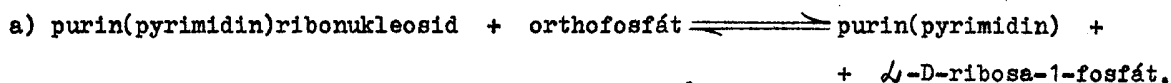
(Sloučeniny či skupiny označené ⁺) jsou značené radioizotopem ¹⁴C případně ³H; purinovými respektive pyrimidinovými ribonukleosidy jsou guanosin, inosin, cytidin a uridin).

Přenos ribosylových skupin podle shora uvedeného principu probíhá v důsledku příznivého složení enzymového aparátu bakteriálních extraktů, aplikovaných jako nepurifikované enzymové preparáty. Je výhodné, že enzymové preparáty neobsahují adenosindeaminázu, respektive že lze tento degradativní enzym odstranit z enzymových preparátů jednoduchou termickou inaktivací, aniž by docházelo ke snížení enzymové aktivity enzymů syntetizujících radioaktivní adenosin.

Má zásadní význam, že enzymové preparáty katalyzují nejen reakci typu:



ale zůstávají zcela funkční rovněž při přenosech ribosylu typu "purin-purin" a "purin-pyrimidin" podle předpokládaného reakčního schématu:



Substrátová specifita enzymových preparátů je dostatečně široká, což dovoluje použít v reakcích všechny základní, přirozeně se vyskytující ribonukleosidy purinového i pyrimidinového typu (adenosin, guanosin, cytidin a uridin), a rovněž některé ribonukleosidy minoritních bází (například inosin). Tato okolnost je mimořádně důležitá proto, že je možné v reakcích aplikovat výše zmíněné základní ribonukleosidy nespecificky značené radioizotopem ¹⁴C respektive ³H a připravit tak radioaktivní adenosin značený radioizotopy ¹⁴C respektive ³H nejen v bázi, ale alternativně v bázi či ribosylovém zbytku, případně nespecificky v celé molekule nebo kombinovaně oběma zmíněnými radioizotopy.

Všechny vedlejší radioaktivní produkty shora uvedených reakcí jsou biologicky aktivní a tudíž i komerčně vysoce zajímavé sloučeniny; z reakčních směsí je lze jednoduše izolovat.

Přenos ribosylu podle shora uvedených reakcí probíhá v prostředí libovolného vhodného pufru, s výhodou 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 6,5 až 7,5.

Enzymová syntéza radioaktivního adenosinu byla sledována v širokém rozmezí reakčních teplot od 275 K do 311 K. Z časového průběhu syntézy radioaktivního adenosinu při teplotě 277 K, 293 K a 310 K, jak je dále uvedeno v příkladu, vyplývá, že enzymovou syntézu radioaktivního adenosinu dle předmětného vynálezu lze provádět při teplotě fyziologické (310 K) i laboratorní (293 K), avšak s výhodou při 277 K, kdy se docílí vysokého stupně přeměny radioaktivního adeninu na adenosin (více než 90 %),

206 950

aniž dochází k fosforolýze adenosinu.

Produkci radioaktivního adenosinu lze ovlivnit volbou molárního poměru adeninu jako akceptoru ribosylové skupiny a Δ -D-ribosa-1-fosfátu respektive ribonukleosidů jako donorů ribosylu. Při molárním poměru adenin : donor ribosylu v rozmezí od 1 : 2 do 1 : 3 je radioaktivní adenosin již dominujícím produktem enzymové reakce a v závislosti na množství enzymového preparátu a době reakce se zpravidla docílí konverze radioaktivního adeninu na adenosin vyšší než 90 %.

Izolace radioaktivního adenosinu, případně vedlejších reakčních produktů z reakčních směsí, se provádí po deproteinaci inkubačních roztoků chromatograficky. U látek s vysokou molovou aktivitou je výhodná papírová chromatografie v některém z následujících chromatografických systémů:

- a) 1-Butanol - 1-propanol - hydroxid amonný - voda (7 : 5 : 7 : 2),
- b) 1-butanol nasycený vodou,
- c) 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5).

Způsoby přípravy radioaktivního adenosinu, značeného radioizotopem ^{14}C respektive ^3H , jsou uvedeny v příkladech, aniž je tím omezena aplikační šíře použitého principu.

Příklad 1

Enzymová syntéza [adenin- $^{14}\text{C}(\text{U})$]adenosinu

Směs [$\text{U-}^{14}\text{C}$]adeninu (30 μmol ; molová radioaktivita 9 250 MBq.mmol $^{-1}$) a uridinu (90 μmol) byla rozpuštěna ve 4 ml 0,2 M Tris-HCl pufru o pH 6,5 a inkubována s 2 ml enzymového preparátu po dobu 3 hodin při 310 K. Inkubace byla ukončena zahřátím roztoku ve vroucí vodní lázni po dobu 1 až 2 minut. Reakční směs byla chromatografována na papíře Whatman č. 3 v soustavě 1-butanolu nasyceného vodou při laboratorní teplotě a v sestupném uspořádání. Autoradiografií byl detegován [adenin- $^{14}\text{C}(\text{U})$]adenosin jako hlavní reakční produkt; vedle toho byl detegován ještě nezreagovaný [$\text{U-}^{14}\text{C}$]adenin. Stupeň konverze radioaktivního adeninu na radioaktivní adenosin byl za shora uvedených podmínek 91,4 %. [adenin- $^{14}\text{C}(\text{U})$]Adenosin byl z chromatografického papíru eluován vodou a jeho identita ověřena ještě kvalitativní papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol - 1-propanol - hydroxid amonný - voda (7 : 5 : 7 : 2) a 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5); v uvedených chromatografických systémech byl preparát radiochemicky čistý. Výtěžek [adenin- $^{14}\text{C}(\text{U})$]adenosinu byl 79,3 %, vztaženo na celkovou radioaktivitu výchozího [$\text{U-}^{14}\text{C}$]adeninu. Molová radioaktivita preparátu byla 9 250 MBq.mmol $^{-1}$.

Příklad 2

Enzymová syntéza [8- ^{14}C]adenosinu

Směs [8- ^{14}C]adeninu (10 μmol ; molová radioaktivita 1 850 MBq.mmol $^{-1}$) a Δ -D-ribosa-1-fosfátu (20 μmol) byla rozpuštěna ve 4 ml 0,2 M Tris-HCl pufru

o pH 6,5 a inkubována s 2 ml enzymového preparátu po dobu 1,5 hodiny při 311 K. Inkubace byla ukončena zahřátím roztoku ve vroucí vodní lázni po dobu 1 až 2 minut. Reakční směs byla chromatografována na papíře Whatman č. 3 v soustavě 1-butanolu nasyceného vodou při laboratorní teplotě a v sestupném uspořádání. Autoradiografií byl detegován pouze [adenin- ^{14}C (U)]adenosin jako jediný reakční produkt. Radioaktivní adenosin byl z chromatografického papíru eluován vodou a jeho radiochemická čistota byla ověřena ve stejných rozpouštědlových systémech jako v předchozím případě (viz příklad 1); preparát byl radiochemicky čistý. Výtěžek [8- ^{14}C]adenosinu byl 85,6 %, vztaženo na celkovou radioaktivitu výchozího [8- ^{14}C]adeninu. Molová radioaktivita preparátu byla 1 850 MBq.mmol $^{-1}$.

Příklad 3

Enzymová syntéza [U- ^{14}C]adenosinu

Směs [U- ^{14}C]adeninu (0,5 μmol ; molová radioaktivita 9 250 MBq.mmol $^{-1}$) a [U- ^{14}C]guanosinu (1,5 μmol ; molová radioaktivita 11 100 MBq.mmol $^{-1}$) byla rozpuštěna v 0,3 ml 0,2 M Tris-HCl pufru o pH 7,0 a inkubována s 0,2 ml enzymového preparátu po dobu 40 minut při 310 K. Inkubace byla ukončena zahřátím roztoku ve vroucí vodní lázni po dobu 1 až 2 minut. Reakční směs byla chromatografována na papíře Whatman č. 3 v soustavě 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5). Autoradiografií a porovnáním s referenčními standardy byly detegovány [U- ^{14}C]adenosin a [U- ^{14}C]adenin a dále [U- ^{14}C]guanosin a [U- ^{14}C]guanin. Radioaktivní látky byly z chromatografického papíru eluovány vodou a stanovena jejich celková radioaktivita. Celkově bylo získáno: 4,5 MBq [U- ^{14}C]adenosinu, 1,1 MBq [U- ^{14}C]adeninu, 12,6 MBq [U- ^{14}C]guanosinu a 1,9 MBq [U- ^{14}C]guaninu. Identita [U- ^{14}C]adenosinu byla ověřena ještě kvalitativní papírovou chromatografií v soustavě 1-butanol - 1-propanol - hydroxid amonný - voda (7 : 5 : 7 : 2) a 1-butanolu nasyceném vodou; v obou rozpouštědlových systémech byl preparát radiochemicky čistý. Molová radioaktivita [U- ^{14}C]adenosinu byla 9 880 MBq.mmol $^{-1}$.

Příklad 4

Enzymová syntéza [8- ^{14}C]adenosinu v závislosti na reakční teplotě

Směs [8- ^{14}C]adeninu (0,5 μmol ; molová radioaktivita 1 850 MBq.mmol $^{-1}$) a uridinu (1,5 μmol) byla rozpuštěna v 0,5 ml 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 6,5 a inkubována s 0,1 ml enzymového preparátu po dobu 30 hodin při reakční teplotě 277 K, 293 K respektive 310 K. Průběh inkubace byl v časových intervalech vyhodnocen radiochromatografickou analýzou. Bylo zjištěno, že při fyziologické teplotě (310 K) se docílí optimální přeměny adeninu na adenosin již v 1 hodině reakce (92,3 % adenosinu), zatímco při laboratorní teplotě (293 K) proběhne v téže době přeměna adeninu na adenosin z 80 % a při anomálně snížené reakční teplotě (277 K) pouze z 50 %. V dalších fázích inkubace dochází při teplotě 293 K a zejména 310 K k výrazné zpětné konverzi adenosinu na adenin, za-

206 950

tímco při 277 K má syntéza adenosinu po celou dobu inkubace trvale vzestupný charakter. Ve 30 hodině reakce je při 310 K fosforolýza adenosinu na adenin úplná, při 293 K zůstává v reakční směsi pouze 19 % radioaktivního adenosinu, zatímco při 277 K představuje radioaktivní adenosin 94 % celkové radioaktivity reakční směsi a k jeho fosforolýze nedochází.

Příklad 5

Enzymová syntéza $[2\text{-}^3\text{H}, \text{ribose-}^{14}\text{C}(\text{U})]$ adenosinu

Směs $[2\text{-}^3\text{H}]$ adeninu ($10\text{ }\mu\text{mol}$; molová radioaktivita $740\text{ GBq}\cdot\text{mmol}^{-1}$) a $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ uridinu ($10\text{ }\mu\text{mol}$; molová radioaktivita $16\text{ GBq}\cdot\text{mmol}^{-1}$) byla rozpuštěna ve 2 ml 0,2 M Tris-HCl pufru o pH 6,5 a inkubována s 1,0 ml enzymového preparátu při 310 K po dobu 1,5 hodiny. Zahřátím reakční směsi ve vroucí vodní lázni po dobu 1 až 2 minut byla reakce ukončena. Reakční směs byla chromatografována na papíře Whatman č. 3 v soustavě 1-butanol - 1-propanol - hydroxid amonný - voda (7 : 5 : 7 : 2) při laboratorní teplotě a v sestupném uspořádání. Rechromatografie radioaktivního adenosinu byla provedena v soustavě 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5). Výtěžek $[2\text{-}^3\text{H}, \text{ribose-}^{14}\text{C}(\text{U})]$ adenosinu byl 43 %, radiochemická čistota preparátu ve shora uvedených rozpouštědlových soustavách a v soustavě 1-butanolu nasyceného vodou byla vyšší než 98 %.

P ř e d m ě t v y n á l e z u

1. Způsob enzymové syntézy radioaktivního adenosinu, značeného radioizotopem ^{14}C nebo ^3H specificky či nespecificky, anabolickou přeměnou radioaktivního či neradioaktivního adeninu na radioaktivní adenosin katalytickým účinem enzymových preparátů izolovaných z bakterií *Escherichia coli* B, v přítomnosti donorů ribosylových skupin, s výhodou Δ -D-ribose-1-fosfátu respektive radioaktivních nebo neradioaktivních ribonukleosidů, v prostředí vhodného pufru, s výhodou Tris-HCl pufru o pH 6,5 až 7,5 a při vhodné reakční teplotě, vyznačený tím, že jako katalyzující enzymové preparáty se použijí nepurifikované supernatantní frakce získané odstředěním homogenátů bakterií *Escherichia coli* B při 105.000 x g.
2. Způsob dle bodu 1, vyznačený tím, že se katalytická reakce provádí při teplotě 275 až 311 K, s výhodou při teplotě 277 K.