



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

201 337

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 19 09 78
(21) PV 6042-78

(51) Int. Cl.³ C 07 H 19/20

(40) Zveřejněno 29 02 80
(45) Vydáno 01 03 83

(75)
Autor vynálezu NEJEDLÝ ZDENĚK, VOTRUBA IVAN, PEČ VLADIMÍR, FILIP JIŘÍ, KOLINA JOSEF
ŠKODA JAN, PRAHA

(54) Způsob enzymové syntézy radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu, značených specificky nebo nespecificky radioizotopem ^{14}C nebo ^3H

1

Předmětem vynálezu je způsob enzymové syntézy radioaktivních ribonukleosid-5'-monofosfátů, ribonukleosid-5'-difosfátů a ribonukleosid-5'-trifosfátů adeninu a guaninu, značených v molekule specificky nebo nespecificky radioizotopem ^{14}C nebo ^3H , založený na fosforibosylaci radioaktivního adeninu a guaninu, resp. fosforylaci radioaktivního adenosinu za katalýzy polyenzymovým preparátem izolovaným z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* v přítomnosti fosforibosylových, resp. fosfátových skupin a hořečnatých iontů.

Způsob enzymové syntézy radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů podle vynálezu využívá katalytických vlastností enzymového preparátu z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, získaných specifickým postupem izolace enzymového preparátu z bezbuněčných extraktů kvasinek, jak uvádíme dále. Enzymový preparát je souborem šesti enzymů, a to adenosin-kinasy, adeninfosforibosyltransferasy, hypoxanthinfosforibosyltransferasy, ribosofosfátpyrofosfokinasy, nukleosidmonofosfátkinasy a nukleosiddifosfátkinasy, které buď jednotlivě nebo ve vzájemné kombinaci katalyzují syntézu shora uvedených radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů. Řízeným způsobem lze takto aplikací zmíněného enzymového preparátu připravit v jediné reakci radioaktivní ribonukleosid-5'-fosfáty adeninu a guaninu z jejich radioaktivníchází nebo nukleosidů o požadovaném stupni fosforylace, včetně

201 337

přímé enzymové syntézy radioaktivního adenosin-5'-trifosfátu z radioaktivního adeninu. Pro tyto specifické vlastnosti, které uvedený enzymový preparát charakterizují, uvádíme ho dále jako polyenzymový preparát z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Široká substrátová specifická polyenzymového preparátu kromě toho dovoluje aplikovat různé donory fosfátových a fosforibosylových skupin, což dále rozšiřuje počet možných reakčních kombinací pro enzymovou syntézu radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu.

Při enzymové syntéze radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů podle vynálezu se neprojevuje vliv degradativních enzymů; v průběhu reakcí nedochází k poklesu molové radioaktivity produkovaných ribonukleosid-5'-fosfátů a stupeň konverze obou purinových bází, resp. adenosinu na ribonukleosid-5'-fosfáty zpravidla převyšuje 90 %.

Aplikace radioaktivních 5'-ribonukleotidů, včetně ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu, značených radioizotopem ^{14}C nebo ^3H , má pro řešení problémů základního výzkumu mnoha vědních oborů zásadní význam a je dnes již rozsáhlá. Zejména adenosin-5'-trifosfát jako nejdůležitější součást metabolického "poolu" živé buňky a přímý precursor pro biosyntézu ribonukleových kyselin, je ve formě značené vhodným radioizotopem látkou vysoce atraktivní.

Stávající způsoby přípravy radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu vycházejí z metodických možností organické syntézy a biosyntézy. Nejméně vhodné jsou postupy organické syntézy, a to pro nutnost specifického chránění funkčních skupin výchozích látek, velký počet reakčních stupňů a požadavek vysoké stereospecificity. Prakticky nepoužitelné jsou tyto postupy pro přípravu radioaktivních preparátů o vysoké molové radioaktivitě.

Mnohem větší možnosti pro přípravu radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu poskytuje naopak celá metodická oblast biochemických syntéz. Příkladem může být izolace radioaktivních ribonukleosid-5'-monofosfátů adeninu a guaninu, nespecificky značených v molekule radioizotopem ^{14}C , z nukleových kyselin jednobuněčných zelených nebo modrozelených řas pěstovaných autotrofně v atmosféře radioaktivního kysličníku uhlíčitého. Uvedený příklad je typem charakteristickým pro nespecifický způsob biosyntézy radioaktivních 5'-ribonukleotidů; radioaktivní ribonukleosid-5'-monofosfáty adeninu a guaninu se zde získají jako součást komplexu dalších základních radioaktivních nukleosid-5'-monofosfátů ribonukleové i deoxyribonukleové řady. Specifické způsoby biosyntézy 5'-ribonukleotidů se vyznačují naopak tím, že vedou zpravidla k tvorbě jediného reakčního produktu; metodicky spadájí do oblasti enzymových syntéz a provádějí se téměř výlučně pomocí enzymů tak zvaných "zachraňujících" mechanismů ("salvage" mechanismus), jimiž jsou některé biologické systémy vybaveny.

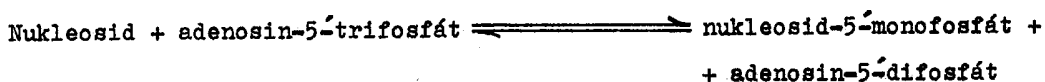
Pokud jde o možnosti specifické enzymové syntézy radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu, připadá především v úvahu využití katalytických vlastností adeninfosforibosyltransferasy [E.C. 2.4.2.7., AMP: pyrofosfátfosforibosyltrans-

201 337

- 2) Existují dva základní typy purinových fosforibosyltransferas, a to adeninfosforibosyltransferasa [E.C. 2.4.2.7.], která je aktivní vůči adeninu a některým jeho derivátům, ale nikoli vůči guaninu a hypoxanthinu, a dále hypoxanthinfosforibosyltransferasa [E.C. 2.4.2.8.], aktivní naopak vůči hypoxanthinu, guaninu, případně i xanthinu, avšak zcela neaktivní vůči adeninu a jeho derivátům. Určitá nejasnost, zda totiž obecně existuje v biologických systémech jediná fosforibosyltransferasa, aktivní vůči guaninu a hypoxanthinu, či zda jde o dva specifické enzymy, není však dosud uspokojivě zodpovězena.
- 3) Purinové fosforibosyltransferasy patří k nestabilním termolabilním enzymům. Míra jejich stability je závislá, mimo jiné, na stupni jejich purifikace, resp. na způsobu jejich izolace z tkáňových homogenátů. Udává se například ztráta 25 až 35 % enzymové aktivity adeninfosforibosyltransferasy izolované z kvasinek, a to během 6 týdnů skladování enzymového preparátu při -15°C , ale také ztráta 33 % enzymové aktivity v enzymovém preparátu izolovaném z Ehrlichova ascitického tumoru, a to během 3 dní skladování při -20°C .
- 4) Katalytická účinnost obou enzymů je obecně podmíněna přítomností dvojmocných kationtů, zpravidla Mg^{2+} -iontů, ale rovněž Mn^{2+} - nebo Ca^{2+} -iontů.

Purifikací do vysokého stupně (1000 až 1200 násobnou) byly adeninfosforibosyltransferasa i hypoxanthinfosforibosyltransferasa připraveny z kvasinek *Schizosaccharomyces pombe* ve formě homogenních enzymů o definované molekulové hmotnosti (Nagy, M. a Ribot, A. M., Eur. J. Biochem. **77**, 77 /1977/). Takto vysoce purifikované enzymy jsou ovšem extrémně termolabilní a rychle ztrácejí enzymovou aktivitu. Tomu se dá zčásti zabránit jejich přechováváním při -20°C v prostředí 5-fosfo- γ -D-riboso-1-difosfátu a chloridu hořečnatého o vysoké koncentraci; za těchto podmínek si enzymy zachovávají stabilitu přibližně 4 týdny. Termolabilitu adeninfosforibosyltransferasy lze blokovat již v průběhu izolace enzymu z kvasinek, a to nasycením tkáňových homogenátů kyselinou adenylovou, tedy vlastním produktem reakce katalyzované zmíněným enzymem.

Fosforylace purinových i pyrimidinových nukleosidů na nukleosid-5'-fosfáty v přítomnosti adenosin-5'-trifosfátu probíhá podle reakce:



a považuje se za alternativní proces k doplnění nukleotidového "poolu" v živé buňce.

Fosforylace adenosinu pomocí adenosin-5'-trifosfátu v přítomnosti extraktů z kvasinek je dokonce historicky prvou zmínkou o studiu enzymové syntézy nukleotidu (Ostern, P. a Terszakowec, J., Hoppe - Seylers Z. Physiol. Chem. **250**, 155 /1937/). Později byl enzym, zodpovědný za tuto reakci, identifikován v částečně purifikovaných extraktech z kvasinek, resp. ledvin a jater králíka (Caputto, R., J. Biol. Chem. **189**, 801 /1951/; Kornberg, A. a Pricer, W. E. Jr., J. Biol. Chem. **193**, 481 /1951/) a defi-

nován jako adenosinkinasa [E.C. 2.7.1.20., ATP: Adenosin-5'-fosfotransferasa]. Dalšímu studiu biologické role enzymu a jeho vlastností bránila vysoká nestabilita, která se navíc zvětšovala úměrně s rostoucím stupněm purifikace. Přesto byly nalezeny způsoby izolace enzymu z normálních i maligních živočišných tkání /Schnebli, H. P., Hill, D. L. a Bennett, L. L. Jr, J. Biol. Chem. 242/1997 (1967); Lindberg, B., Klenow, H. a Hansen, K., J. Biol. Chem. 242, 350 (1967); Lindberg, B., Klenow, H. a Hansen, K., J. Biol. Chem. 242, 350 (1967); Lindberg, B., Biochim. Biophys. Acta 185, 245 (1969); Divekar, A. Y. a Hakala, M. T., Mol. Pharmacol. 7, 663 (1971); Henderson, F. J., Mikoshiba, A., Chu, S. Y. a Caldwell, I. C., J. Biol. Chem. 247, 1972 (1972)/, které dovolily blíže charakterizovat substrátovou specifitu a některé další vlastnosti adenosinkinasy a studovat její kinetické a molekulární vlastnosti. Z pivovarských kvasinek bylo dokonce izolováno několik izoenzymů, vykazujících adenosinkinasovou aktivitu /Leibach, T. K., Speiss, G. I., Neudecker, T. J., Peschke, G., Puchwein, G. a Hartman, G. R., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 328 (1971)/. Enzymy byly izolovány ve formě molekulárně homogenních polypeptických řetězců o molekulové hmotnosti kolem 40 000. Enzymy jsou vysoce labilní a jejich enzymovou aktivitu lze jak při skladování, tak v průběhu purifikačního procesu bezpečně uchovat pouze v přítomnosti adenosinu o vysoké koncentraci (zpravidla 5 milimolárního roztoku adenosinu). Jako stabilizátor enzymové aktivity je adenosin specifický a nemůže být nahrazen žádným jiným přirozeně se vyskytujícím nukleosidem. V určitém rozsahu může protektivní účinky adenosinu nahradit dithiothreitol. Odstranění stabilizátorů vede k úplné ztrátě enzymové aktivity vysoce purifikovaných kinas. Proces je doprovázen agregací enzymové aktivních jednoduchých polypeptidů v inaktivní makromolekuly o molekulové hmotnosti kolem 400 000.

Specifita adenosinkinasy izolovaných z různých zdrojů a různými purifikačními postupy je shodně vymezena s ohledem na nukleosidový substrát: fosforylaci adenosinu a některých jeho strukturálních analog katalyzují intenzivně, zatímco vůči guanosinu, inosinu a všem pyrimidinovým ribo- nebo deoxyribonukleosidům jsou zcela inaktivní. 2'-Deoxyadenosin je fosforylován jen zanedbatelně, a to pouze vysoce purifikovanými preparáty enzymu. Substrátová specifita adenosinkinasy vůči donorům fosfátových skupin je podstatně širší; vedle adenosin-5'-trifosfátu lze v určitých případech aplikovat rovněž jiné nukleosid-5'-trifosfáty, vždy však s výrazně menší účinností.

Katalytický účín adenosinkinasy je obecně podmíněn přítomností dvojmocných kationtů, obvykle Mg^{2+} - nebo Mn^{2+} -iontů. Naproti tomu optimální pH enzymových reakcí je individuálně závislé na zdroji a způsobu purifikace adenosinkinasy; v některých případech byla u adenosinkinasy zaznamenána dvě reakční pH optima.

Jestliže není pochyb o existenci adenosinkinasy v živých buňkách, pak existence guanosinkinasy není prokázána, a některé informace v tomto směru je nutno brát jako předběžné.

Výčet informací o biologických a fyzikálně-chemických vlastnostech adeninfosforibosyltransferasy, hypoxanthinfosforibosyltransferasy a adenosinkinasy, jak je shora

201 337

v přehledu uveden, lze shrnout do těchto hlavních závěrů:

- 1) Přítomnost uvedených enzymů byla prokázána v normálních i maligních živočišných tkáních, v bakteriích a v kvasinkách. Z kvasinek byly enzymy izolovány v molekulárně homogenní formě.
- 2) Enzymy katalyzují v přítomnosti donorů fosforibosylových, resp. fosfátových skupin fosforibosylaci adeninu a guaninu, resp. fosforylaci adenosinu, při čemž reakčními produkty jsou ribonukleosid-5'-monofosfáty adeninu a guaninu.
- 3) Enzymy jsou nestabilní, při čemž míra jejich nestability závisí především na způsobu izolace z tkání a vzrůstá s počtem purifikačních stupňů. Osvědčenými stabilizátory enzymů jsou buď reakční produkty nebo výchozí substráty katalyzovaných enzymových reakcí.

Enzymová syntéza radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu o vysoké molové radioaktivitě, značených v molekule radioizotopem ^{14}C resp. ^3H , má však své specifické zvláštnosti, které ve shora uvedených studiích se speciálním zaměřením nejsou řešeny, které je však nutno zásadně respektovat při návrhu technologického modelu přípravy radioaktivních purinových ribonukleotidů v preparativním měřítku. Jde zejména o tato specifika:

- a) Při izolaci enzymů z tkáňových homogenátů je nezbytné odstranit kvantitativně nukleové kyseliny a zamezit tak jejich přítomnosti v purifikovaných enzymových preparátech. V opačném případě nelze vyloučit atakování nukleových kyselin nukleasami v průběhu enzymových reakcí, což vede k sekundárnímu vzniku neaktivních nukleotidů. Tyto neaktivní nukleotidy mohou inhibovat katalytickou účinnost enzymů, v každém případě však snižují molovou radioaktivitu purinových ribonukleotidů značených radioizotopy.
- b) Příprava radioaktivních purinových nukleotidů v technologickém měřítku je realizovatelná za předpokladu, že jsou k dispozici enzymové preparáty, jejichž katalytická účinnost se zachová minimálně po dobu několika týdnů nebo měsíců skladování. Bylo již shora uvedeno, že dosud publikované postupy přípravy enzymových systémů vedly pouze k vysoce labilním enzymovým preparátům.
- c) Blokovat labilitu katalyzujících enzymů produkty či substráty katalyzovaných reakcí, ať již v průběhu purifikace nebo skladování enzymových preparátů, není v případě enzymové syntézy radioaktivních purinových nukleotidů možné, protože by docházelo k mnohonásobnému snížení jejich molové radioaktivity.
- d) V případě enzymové fosforylace adenosinu nelze aplikovat adenosin-5'-trifosfát jako všeobecně užívaný donor fosfátových skupin, a to opět z důvodu případného nežádoucího snížení molové radioaktivity produkovaného adenosin-5'-monofosfátu.

Kromě těchto čistě radiochemických aspektů je při navrhování universálního enzymového způsobu přípravy radioaktivních purinových ribonukleosid-5'-fosfátů nutno vzít v úvahu ještě další podstatné okolnosti:

- A) Metody přípravy radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu se obecně zaměřují především na získání adenosin-5'-trifosfátu a guanosin-5'-trifosfátu jako

primárních prekursorů pro studium biosyntézy ribonukleových kyselin a řadu dalších studií. Shora uvedené enzymové reakce využívající katalytických vlastností purinových fosforibosyltransferas a adenosinkinasy však přímou syntézu obou zmíněných radioaktivních nukleotidů z jednoduchých radioaktivních substrátů neumožňují; ve všech případech jsou finálními produkty ribonukleosid-5'-monofosfáty adeninu a guaninu. Nalzení způsobu jednoduché přípravy radioaktivních ribonukleosid-5'-trifosfátů adeninu a guaninu enzymovou cestou je proto aktuálním problémem.

B) V enzymových systémech, studujících vlastnosti fosforibosyltransferas adeninu a guaninu, resp. adenosinkinasy, se zpravidla aplikují purifikované enzymy, zcela specifické vůči uvedeným substrátům; katalytické vlastnosti dalších přítomných enzymů se obvykle nezkoumají. Tento přístup je pro vypracování obecného modelu enzymové syntézy radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů jak adeninu, tak guaninu, navíc o libovolně požadovaném stupni fosforylace, nevyhovující. Řešení problému spočívá naopak v přípravě enzymového preparátu, obsahujícího veškeré enzymy potřebné k syntéze shora uvedené škály radioaktivních nukleotidů a zbaveného přitom nežádoucích degradativních enzymů.

Vynález uvádí právě takový způsob enzymové syntézy širokého souboru ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu specificky nebo nespecificky značených v molekule radioizotopem ^{14}C resp. ^3H , jehož základem je využití specifických katalytických vlastností polyenzymového preparátu izolovaného nově vypracovaným postupem z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

Princip způsobu enzymové syntézy radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu podle předmětného vynálezu spočívá ve fosforibosylaci radioaktivního adeninu a guaninu, resp. fosforylaci adenosinu, případně v kombinaci fosforibosylace a fosforylace uvedených radioaktivních složek nukleových kyselin, a to katalytickým účinem specifických enzymů přítomných v polyenzymovém preparátu izolovaném z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Zmíněné enzymové reakce probíhají v přítomnosti donorů fosforibosylových skupin, s výhodou 5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfátu, dále v přítomnosti donorů fosfátových skupin, s výhodou adenosin-5'-trifosfátu nebo guanosin-5'-trifosfátu, případně v přítomnosti systému regenerujícího donory fosfátových skupin, s výhodou v přítomnosti kreatinfosfokinasy a kreatinfosfátu. Pro průběh enzymových reakcí je žádoucí přítomnost dvojmocných kationtů s výhodou hořečnatých iontů. Enzymové reakce probíhají v prostředí libovolného vhodného pufru s výhodou Tris-HCl pufru o pH 7,5 až 8,0 a dále při optimální reakční teplotě, s výhodou při 37 °C.

Polyenzymový preparát z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se připravuje dále popsaným způsobem. Čerstvá kultura kvasinek se suspenduje v 0,02 M Tris-HCl pufru o pH 7,5 a vzniklá suspenze se odstředí při 5 000 x g a 0 až 4 °C během 40 minut (pokud to není výslovně uvedeno jinak, tak i všechny další operace se provádějí při 0 až 4 °C a v prostředí 0,02 M Tris-HCl pufru o pH 7,5). Supernatantní frakce se odstraní a sediment se znovu suspenduje v pufru tak, že 0,8 až 1,0 g vlhké váhy

201 337

kvasinek připadá na 10 ml pufru. Suspenze se homogenizuje ultrazvukem (příkon 60 Watt, frekvence 22 kHz) po dobu 2 minut. Homogenát se zcentrifuguje při 25 000 x g během 30 minut a buněčné debrisy se odstraní. K supernatantní frakci se postupně přidává 15% vodný roztok streptomycinsulfátu, jímž se totálně vysrážejí buněčné nukleové kyseliny. Po jejich odstranění odstředěním při 30 000 x g během 20 minut se čistý roztok dvoustupňově saturuje pevným síranem amonným. V prvním stupni se syčením roztoku na 50 % saturace vysrážejí kontaminující bílkoviny a pigmenty, které se odstraní odstředěním. Ve druhém stupni se syčením roztoku síranem amonným na 85 % a následujícím stáním při 0 až 4 °C po dobu několika hodin vyloučí sraženina, která se odstředí, rozpustí v pufru, a podrobí gelové filtraci (G-25 /coarse/). Touto frakcionací se získá surový polyenzymový preparát, zbavený síranu amonného a streptomycinsulfátu, a ten se dále purifikuje ve dvou stupních na DEAE-celulose. V prvním stupni se polyenzymový preparát adsorbuje na DEAE-celulose a zbaví se kontaminujících bílkovin promytím pufrům; promývání se ukončí v okamžiku, kdy eluční roztok vykazuje nulovou absorbanci při 280 nm. Desorpce polyenzymového preparátu se provede 0,25 M roztokem chloridu sodného v pufru. Ve druhém stupni se roztok polyenzymového preparátu nejprve desetinnásobně zředí pufrům, znovu se adsorbuje na DEAE-celulose a promyje 0,05 M roztokem chloridu sodného v pufru. Desorpce polyenzymového preparátu se uskuteční 0,175 M roztokem chloridu sodného v pufru. Roztok polyenzymového preparátu se rozdělí na menší podíly, které se skladují při -20 °C.

V polyenzymovém preparátu, izolovaném shora popsáním způsobem z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, byla bezpečně prokázána existence dále uvedených enzymů, jejichž katalytických vlastností bylo buď jednotlivě nebo v jejich vzájemné kombinaci využito k enzymové syntéze ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu, značených v molekule radioaktivními izotopy ^{14}C , resp. ^3H :

1. Adenosinkinasa [E.C. 2.7.1.20., ATP: adenosin-5'-fosfotransferasa].
2. Adeninfosforibosyltransferasa [E.C. 2.4.2.7., AMP: pyrofosátfosforibosyltransferasa].
3. Hypoxanthinfosforibosyltransferasa [E.C. 2.4.2.8., IMP: pyrofosátfosforibosyltransferasa].
4. Ribosofosfátpyrofosfokinasa [E.C. 2.7.6.1., ATP: D-ribosa-5-fosfátpyrofosfotransferasa].
5. Nukleosidmonofosfátkinasa [E.C. 2.7.4.4., ATP: nukleosidmonofosfátfosfotransferasa].
6. Nukleosiddifosfátkinasa [E.C. 2.7.4.6., ATP: nukleosiddifosfátfosfotransferasa].

Naproti tomu byly v průběhu purifikačního procesu odstraněny z polyenzymového preparátu degradativní enzymy, zejména enzymy ze skupiny nukleotidfosfohydrolas, aminohydrolas a ATP-fosforylas. Degradativní enzymy byly eliminovány buď zcela nebo do té míry, že jejich přítomnost již podstatně neovlivňuje účinnost enzymů katalyzujících syntézu radioaktivních nukleotidů. Z polyenzymového preparátu byly kromě toho kvantitativně odstraněny nukleové kyseliny, takže se nesnižuje molová radioaktivita vznikajících nukleotidů.

Díky těmto vlastnostem slouží uvedený polyenzymový preparát k produkci širokého souboru radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu, a to tím, že katalyzuje reakce adeninu, guaninu, resp. adenosinu s rozličnými donory fosfátových, resp. fosforibosylových skupin. Hlavní možné reakční kombinace uvádíme v tomto přehledu:

Radioaktivní akceptor	Neradioaktivní donor	Produkt
1. Adenin ⁺	5-Fosfo- α -D-ribose-1-difosfát	[adenin ⁺]Adenosin-5'-monofosfát
2. Guanin ⁺	5-Fosfo- α -D-ribose-1-difosfát	[guanin ⁺]Guanosin-5'-monofosfát
3. Adenosin ⁺	Guanosin-5'-trifosfát	Adenosin ⁺ -5'-monofosfát
4. Adenosin ⁺	Guanosin-5'-trifosfát; Kreatinfosfát a kreatinfosfo- kinasa	Adenosin ⁺ -5'-trifosfát
5. Adenin ⁺	5-Fosfo- α -D-ribose-1-difosfát; Guanosin-5'-trifosfát; Kreatinfosfát a kreatinfosfo- kinasa	[adenin ⁺]Adenosin-5'-trifosfát

⁺ Specificky či nespecificky značeno radioizotopem ^{14}C nebo ^3H

Okruh produktů hlavních reakčních kombinací se rozšiřuje o další typy výběrem různě značených radioaktivních substrátů (značené radioizotopem ^{14}C , resp. ^3H , značené v molekule specificky či nespecificky, a pokud je výchozím substrátem adenosin, tedy značené buď v bázi nebo v ribosylovém zbytku).

K dosažení optimálních přeměn typu purin $\longrightarrow$ /purin/ribonukleosid-5'-monofosfát, katalyzovaných specifickými purinfosforibosyltransferasami, přítomnými v polyenzymovém preparátu z kvasinek, bylo nalezeno vhodné složení komponent výchozí reakční směsi v molárním poměru adenin/guanin/: 5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfát: chlorid hořečnatý = 1 : 4 : 10. Podstatným snížením koncentrace hořečnatých iontů až na molární poměr báze : hořečnaté ionty = 1 : 1 se sníží i stupeň konverze, zatímco zvýšení koncentrace hořečnatých iontů je bez podstatného vlivu. Extrémní snížení nebo zvýšení molárního poměru donoru fosforibosylových skupin vůči radioaktivní bázi, například na hodnotu 1 : 1 nebo 10 : 1, vede v každém případě ke snížení produkce radioaktivních ribonukleosid-5'-monofosfátů.

Stupeň konverze radioaktivního guaninu, resp. adeninu na ribonukleosid-5'-monofosfát, lze výrazně ovlivnit množstvím aplikovaného polyenzymového preparátu; optimální množství preparátů izolovaných z různých šarží kvasničných kultur se stanovuje vždy znovu pro každou pokusnou sérii enzymových reakcí.

Při volbě 0,02 M Tris-HCl pufru jako reakčního prostředí byla nalezena dvě reakční optima, a to při pH 7,5 až 8,0 a při pH 9,0. Optimální teplota reakčního prostředí je

201 337

37 °C. V závislosti na koncentraci složek reakční směsi, množství polyenzymového preparátu a jeho enzymové aktivity se pokusně určí optimální reakční doba.

Při dodržení shora uvedených optimálních reakčních podmínek se dosahuje až 90 % přeměny radioaktivního adeninu, resp. guaninu na odpovídající ribonukleosid-5'-monofosfáty.

Skladováním polyenzymového preparátu při -20 °C po dobu 14 týdnů se enzymová aktivita purinových fosforibosyltransferas sníží o 10 %.

V alternativě pro přímou přeměnu radioaktivní báze na ribonukleosid-5'-trifosfát, zejména pak pro případ přímé konverze radioaktivního adeninu na adenosin-5'-trifosfát, se zachovají stejné podmínky jako při enzymové syntéze adenosin-5'-monofosfátu. Pouze složení výchozí reakční směsi se doplní o guanosin-5'-trifosfát jako donor fosfátových skupin, a to obvykle v molárním poměru adenin : guanosin-5'-trifosfát = 1 : 20, a dále o systém kreatinfosfátu a kreatinfosfokinasy, určený k regeneraci donoru fosfátových skupin. Při dodržení uvedených reakčních podmínek proběhne v optimální době reakce přeměna adeninu na adenosin-5'-trifosfát na 90 až 95 %.

Jako další možné varianty enzymové syntézy radioaktivního purinového nukleotidu pomocí polyenzymového preparátu, izolovaného z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, lze výhodně využít katalytických vlastností adenosinkinasy, přítomné v polyenzymovém preparátu, a to pro přeměnu radioaktivního adenosinu na adenosin-5'-monofosfát.

Pro tento případ bylo zvoleno složení výchozí reakční směsi v molárním poměru adenosin : chlorid hořečnatý : guanosin-5'-trifosfát = 1 : 5 : 10. Reakce probíhá v prostředí 0,01 M Tris-HCl pufru o pH 8,0 při teplotě 37 °C. Při shora zvoleném složení reakční směsi a molárním zastoupení jednotlivých složek má na průběh reakce výrazný vliv množství aplikovaného polyenzymového preparátu. Určení optimálního množství polyenzymového preparátu i reakční doby se řídí stejnými zásadami jako v předchozích uvedených případech. Při dodržení optimálního reakčního režimu dosahuje stupeň konverze radioaktivního adenosinu na adenosin-5'-monofosfát až 90 %.

Adenosinkinasa je enzym dostatečně stabilní; při skladování polyenzymového preparátu po dobu 18 týdnů při -20 °C se její enzymová aktivita nemění.

Při zachování reakčních podmínek, uvedených pro syntézu radioaktivního adenosin-5'-monofosfátu z radioaktivního adenosinu, ale po doplnění výchozí reakční směsi o systém kreatinfosfátu a kreatinfosfokinasy, se aktivizují nukleotidkinasy přítomné v polyenzymovém preparátu a dosáhne se přímé přeměny radioaktivního adenosinu na adenosin-5'-trifosfát minimálně z 90 %.

Radioaktivní ribonukleosid-5'-difosfáty adeninu nebo guaninu mohou po úpravě reakčních podmínek vznikat jako vedlejší produkty při fosforibosylaci, resp. fosforylaci adeninu, guaninu nebo adenosinu. Jestliže jsou radioaktivní ribonukleosid-5'-difosfáty adeninu a guaninu jedinými požadovanými produkty, je možné s výhodou postupo-

vat podle obecné metody přípravy radioaktivních nukleosid-5'-difosfátů, kterou jsme popsali dříve (viz čs. patent č. 138399).

Izolace radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu z reakčních směsí se provádí po deproteinaci inkubačních roztoků chromatograficky. U látek s vysokou molovou radioaktivitou je výhodná papírová chromatografie v některém z těchto rozpouštědlových systémů:

- a) 1-butanol - aceton - kyselina octová - 5%ní hydroxid amonný - voda (9 : 3 : 2 : 2 : 4)
- b) 1-butanol - 1-propanol - hydroxid amonný - voda (7 : 5 : 7 : 2)
- c) 1-butanol - kyselina octová - voda (4 : 1 : 5)

Shora uvedenými postupy enzymové syntézy se aplikací polyenzymového preparátu izolovaného z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a vhodnou volbou donorů fosforibosylových resp. fosfátových skupin připravují z radioaktivního adeninu, guaninu nebo adenosinu odpovídající ribonukleosid-5'-fosfáty, a to bez nežádoucího snížení molové radioaktivity a o požadovaném stupni fosforylace. Způsoby přípravy těchto radioaktivních nukleotidů, značených v molekule radioizotopy ^{14}C , resp. ^3H , jsou uvedeny v příkladech, aniž je tím omezena aplikační šíře použitého principu.

Příklad 1

Enzymová syntéza $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ adenosin-5'-monofosfátu

Směs $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ adenosinu (1 μmol ; molová radioaktivita 11 100 MBq.mmol $^{-1}$), chloridu hořečnatého (5 μmol) a guanosin-5'-trifosfátu (10 μmol) byla rozpuštěna v 0,6 ml 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 8,0 a inkubována s 0,4 ml polyenzymového preparátu z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* po dobu 1 hodiny a při 37 °C. Reakční směs byla po termické denaturaci polyenzymového preparátu a jeho odstranění chromatografována preparativně v systému 1-butanol - aceton - kyselina octová - 5%ní hydroxid amonný - voda (9 : 3 : 2 : 2 : 4) na papíře Whatman č. 3, v sestupném uspořádání, při laboratorní teplotě a po dobu 20 hodin. Konverze $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ adenosinu na $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ adenosin-5'-monofosfát proběhla na 91,3 %. Vedlejšími produkty reakce byly nezreagovaný $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ adenosin a $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ adenosin-5'-difosfát v množství 4,7 % resp. 4,0 % celkové radioaktivity reakční směsi. $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ Adenosin-5'-monofosfát byl z chromatografického papíru eluován destilovanou vodou a jeho radiochemická čistota dále ověřena papírovou chromatografií v dalších rozpouštědlových systémech (1-butanol - kyselina octová - voda /4 : 1 : 5/; 1-butanol - 1-propanol - hydroxid amonný - voda /7 : 5 : 7 : 2/; kyselina izolomáselná - - hydroxid amonný - voda /66 : 1,5 : 33/), ve kterých byl identifikován jako radiochemicky čistá látka. Celkově bylo získáno 8,9 MBq $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ adenosin-5'-monofosfátu o molové radioaktivitě 11 100 MBq.mmol $^{-1}$, tj. 78 % radioaktivity výchozího $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ adenosinu.

Příklad 2

Enzymová syntéza $[U-^{14}C]$ adenosinu-5'-trifosfátu

Směs $[U-^{14}C]$ adenosinu (1 μ mol; molová radioaktivita 11 100 MBq.mmol⁻¹), chloridu hořečnatého (5 μ mol), guanosin-5'-trifosfátu (10 μ mol), kreatinfosfátu (7 μ mol) a kreatinfosfokinasy (0,02 mg) byla rozpuštěna v 1,0 ml 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 8,0 a inkubována s 0,2 ml polyenzymového preparátu z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* po dobu 6 hodin při 37 °C. Po odstranění polyenzymového preparátu termickou denaturací byla reakční směs preparativně chromatografována stejně jako v předchozím případě (viz příklad 1). Chromatografickou analýzou bylo zjištěno že konverze $[U-^{14}C]$ adenosinu na $[U-^{14}C]$ adenosin-5'-trifosfát proběhla na 88 %, dalšími složkami reakční směsi byly $[U-^{14}C]$ adenosin-5'-difosfát a nezreagovaný $[U-^{14}C]$ adenosin, v obou případech v množství 6 % celkové radioaktivity reakční směsi. $[U-^{14}C]$ Adenosin-5'-trifosfát byl z chromatografického papíru eluován směsí etanol - voda - hydroxid amonný (20 : 78 : 2) a jeho radiochemická čistota byla ověřena ve stejných rozpouštědlových systémech jako v předchozím případě (viz příklad 1). Celkově bylo získáno 8,3 MBq $[U-^{14}C]$ adenosin-5'-trifosfátu, tj. 75 % radioaktivity výchozího $[U-^{14}C]$ adenosinu, a to o radiochemické čistotě vyšší než 97 % a molové radioaktivitě 11 100 MBq.mmol⁻¹.

Příklad 3

Enzymová syntéza $[adenin-^{14}C/U]$ adenosin-5'-trifosfátu

Směs $[U-^{14}C]$ adeninu (1 μ mol; molová radioaktivita 7 400 MBq.mmol⁻¹), 5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfátu (4 μ mol), chloridu hořečnatého (30 μ mol), guanosin-5'-trifosfátu (20 μ mol), kreatinfosfátu (7 μ mol) a kreatinfosfokinasy (0,02 mg) bylo rozpuštěno v 1,0 ml 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 8,0 a inkubována s 0,4 ml polyenzymového preparátu z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* po dobu 4 hodin při 37 °C. Po termické denaturaci a odstranění polyenzymového preparátu byla reakční směs podrobena kvalitativní chromatografické analýze; bylo zjištěno, že konverze $[U-^{14}C]$ adeninu na $[adenin-^{14}C/U]$ adenosin-5'-trifosfát proběhla na 97 % a jedinou další radioaktivní složkou reakční směsi byl nezreagovaný $[U-^{14}C]$ adenin. Reakční směs byla preparativně chromatografována na papíře Whatman č. 3 v systému 1-butanolu nasyceného vodou, a to po dobu 24 hodin, při laboratorní teplotě a v sestupném uspořádání. $[adenin-^{14}C/U]$ Adenosin-5'-trifosfát byl z chromatografického papíru eluován směsí etanol - voda - hydroxid amonný (20 : 78 : 2) a jeho radiochemická čistota byla ověřena papírovou chromatografií ve stejných rozpouštědlových systémech jako v předchozích případech (viz příklad 1). Celkově bylo získáno 6,07 MBq $[adenin-^{14}C/U]$ adenosin-5'-trifosfátu, což je 82 % radioaktivity výchozího $[U-^{14}C]$ adeninu o molové radioaktivitě 7 400 MBq.mmol⁻¹ a radiochemické čistotě vyšší než 97 %.

Příklad 4

Enzymová syntéza $[8-^{14}\text{C}]$ adenosin-5'-monofosfátu

Směs $[8-^{14}\text{C}]$ adeninu ($8 \text{ } \mu\text{mol}$; molová radioaktivita $1\,850 \text{ MBq}\cdot\text{mmol}^{-1}$), 5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfátu ($32 \text{ } \mu\text{mol}$) a chloridu hořečnatého ($120 \text{ } \mu\text{mol}$) byla rozouštěna v $6,0 \text{ ml}$ $0,1 \text{ M}$ Tris-HCl pufru o pH 7,5 a inkubována s $5,0 \text{ ml}$ polyenzymového preparátu z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* při 37°C po dobu 3 hodin. Inkubace byla ukončena zahřátím reakční směsi ve vroucí vodní lázni po dobu 3 minut a odstraněním denaturovaného polyenzymového preparátu. Chromatografickou analýzou bylo zjištěno, že reakční směs obsahuje pouze dvě radioaktivní látky, a to $[8-^{14}\text{C}]$ adenosin-5'-monofosfát v množství 94 % a $[8-^{14}\text{C}]$ adenosin v množství 6 % celkové radioaktivity reakční směsi. Finální směs byla preparativně chromatografována na papíře Whatman č. 3 v soustavě 1-butanolu nasyceného vodou, a to sestupně po dobu 24 hodin a při laboratorní teplotě. $[8-^{14}\text{C}]$ Adenosin-5'-monofosfát byl z papíru eluován vodou a rechromatografován na papíře Whatman č. 3 v systému 1-butanol - 1-propanol - hydroxid amonný - voda ($7 : 5 : 7 : 2$), v sestupném uspořádání, při laboratorní teplotě a po dobu 18 hodin; z chromatografického papíru byl radioaktivní nukleotid eluován opět destilovanou vodou. Celkově bylo získáno $10,4 \text{ MBq}$ radiochemicky čistého $[8-^{14}\text{C}]$ adenosin-5'-monofosfátu, tj. 70 % radioaktivity výchozího $[8-^{14}\text{C}]$ adeninu o molové radioaktivitě $1\,850 \text{ MBq}\cdot\text{mmol}^{-1}$; radiochemická čistota nukleotidu byla ověřena ve stejných rozpouštědlových systémech jako v předchozích případech (viz příklad 1).

Příklad 5

Enzymová syntéza $[\text{guanin-}^{14}\text{C}/\text{U}]$ guanosin-5'-monofosfátu

Směs $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ guaninu ($1 \text{ } \mu\text{mol}$; molová radioaktivita $7\,400 \text{ MBq}\cdot\text{mmol}^{-1}$), 5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfátu ($4 \text{ } \mu\text{mol}$) a chloridu hořečnatého ($15 \text{ } \mu\text{mol}$) byla rozpuštěna v $0,8 \text{ ml}$ $0,1 \text{ M}$ Tris-HCl pufru o pH 7,5 a inkubována s $0,4 \text{ ml}$ polyenzymového preparátu z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* při 37°C po dobu 3 hodin. Po termické denaturaci a odstranění polyenzymového preparátu byla reakční směs preparativně chromatografována na papíře Whatman č. 3 v systému 1-butanol - kyselina octová - voda ($4 : 1 : 5$) v sestupném uspořádání a při laboratorní teplotě po dobu 18 hodin. Analyticky bylo zjištěno, že reakční směs obsahuje $[\text{guanin-}^{14}\text{C}/\text{U}]$ guanosin-5'-monofosfát v množství 85 %, $[\text{guanin-}^{14}\text{C}/\text{U}]$ guanosin v množství 9 % a $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ guanin v množství 6 % celkové radioaktivity. Radioaktivní nukleotid byl z chromatografického papíru eluován destilovanou vodou a rechromatografován na papíře Whatman č. 3 v soustavě 1-butanol - aceton - kyselina octová - 5%ní hydroxid amonný - voda ($9 : 3 : 2 : 2 : 4$) po dobu 20 hodin, opět v sestupném uspořádání a při laboratorní teplotě. Celkově bylo získáno $4,6 \text{ MBq}$ radiochemicky čistého $[\text{guanin-}^{14}\text{C}/\text{U}]$ guanosin-5'-monofosfátu, tj. 62 % radioaktivity výchozího $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ guaninu o molové radioaktivitě $7\,400 \text{ MBq}\cdot\text{mmol}^{-1}$; radiochemická čistota radioaktivního nukleotidu byla ověřena ve stejných rozpouštědlových systémech jako v předcho-

201 337

zích případech (viz příklad 1).

P ř e d m ě t v y n á l e z u

Způsob enzymové syntézy radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu, značených specificky nebo nespecificky radioizotopem ^{14}C , případně ^3H , založený na fosforylaci radioaktivního adenosinu, resp. fosforibosylaci radioaktivního adeninu a guaninu a následné fosforylaci vzniklých ribonukleosid-5'-monofosfátů katalytickým účinem enzymů z kvasinek, vyznačený tím, že se enzymová syntéza radioaktivních ribonukleosid-5'-fosfátů adeninu a guaninu o požadovaném stupni fosforylace uskutečňuje řízeným způsobem jednostupňovou reakcí, v přítomnosti polyenzymového preparátu z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, v přítomnosti donorů fosforibosylových, resp. fosfátových skupin, s výhodou 5-fosfo- α -D-ribose-1-difosfátu resp. adenosin-5'-trifosfátu nebo guanosin-5'-trifosfátu, dále v přítomnosti kreatinfosfátu a kreatinfosfokinasy a v přítomnosti hořečnatých iontů.