

CS 790 7595

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

166927



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

Přihlášeno 28. VI. 1972 (PV 4605-72)

Zveřejněno 15. VII. 1975

Vydáno 15. I. 1977

Int. Cl.²
C 12 D 13/06

MDT
547.96:621.039.85

Autor vynálezu Ing. ZDENĚK NEJEDLÝ, ing. JIŘÍ FILIP, CSc., PRAHA,
JINDŘICH EKL, KRALUPY nad Vltavou, ing. JOSEF KOLINA, CSc.,
RNDr. IVAN VOTRUBA, CSc., a prof. ing. JAN ŠKODA, DrSc., PRAHA

Způsob přípravy radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu, značeného specificky nebo nespecificky isotopem ¹⁴C, popřípadě ³H

1

Předmětem vynálezu je způsob přípravy radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu, značeného specificky nebo nespecificky isotopem ¹⁴C, popřípadě ³H.

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. Zvláštní pozornost je soustředěna na studium desoxyribonukleové kyseliny a jejích základních stavebních složek. Hlavním důvodem toho je skutečnost, že genetický kód zakotvený v desoxyribonukleové kyselině je prokazatelně materiální základnou dědičnosti. Avšak mnoho otázek, uvádějících do souvislosti právě funkci nukleových kyselin a mechanismus přenosu genetické informace v širších souvislostech, zůstává dosud neobjasněno. Zintenzivněním a prohloubením studia narůstají naopak stále nové problémy, takže tuto etapu výzkumu nukleových kyselin bude nutno považovat zřejmě ještě dlouho za otevřenou.

Neocenitelnou pomocí prakticky pro všechny oblasti výzkumu nukleových kyselin je aplikace základních stavebních kamenů nukleových kyselin — nukleotidů, značených v molekule vhodným radioisotopem. Zvláště významnou roli hrají značené nukleotidy v

2

oblasti studia struktury a enzymové syntesy nukleových kyselin, kde se tato praxe s úspěchem osvědčuje již téměř dvě desetiletí.

Jedním z metodicky nejvýznamnějších prekursorů nukleových kyselin je kyselina thymidylová (thymidin-5'-monofosfát), která je specifickou složkou primární struktury desoxyribonukleové kyseliny. Tato skutečnost činí z thymidin-5'-monofosfátu látku prvořadého významu pro veliký počet biochemických, biologických i klinických pracovišť. V předmětném vynálezu je uveden nový a účinný způsob jejího značení radioaktivními isotopy.

Možná aplikace postupů organické syntesy pro přípravu radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu-¹⁴C, resp. ³H [Khorana, G. H. Federation Proceedings, **19**, 931 (1960); Symons, R. H., Biochim. Biophys. Acta **155**, 609 (1968); Symons, R. H., Biochim. Biophys. Acta **190**, 548 (1969)] mají v porovnání s biosynthetickými postupy četné nevýhody, platné pro přípravu radioaktivních nukleotidů obecně. Radioaktivním substrátem pro shora citované syntesy může být pouze thymidin se specificky chráněnými funkčními skupinami desoxyribosylového zbytku. Příprava thymidin-5'-monofosfátu-¹⁴C, resp. ³H by zde byla v každém případě vícestupňová, což by nevyhnutelně vedlo ke ztrátám

radioaktivních meziproductů. Bylo by zapotřebí závažných zásahů do isolačních a separačních technik organické synthosy, aby modifikovaná radioaktivní synthosa v měřítku pouhých několika mikromolů výchozí radioaktivní látky mohla být vůbec realizována.

Metody biochemické synthosy jsou v tomto ohledu mnohem nadějnější. Především jsou k dispozici enzymové systémy izolované z rozpustných frakcí homogenátů některých normálních i maligních živočišných tkání (například regenerujících krysích jater, Ehrlichových ascitních buněk, jater leukemických myši), obsahujících thymidinkinasu. Katalytickým účinkem tohoto enzymu lze v přítomnosti adenosin-5'-trifosfátu a hořčičných iontů provést konversi radioaktivního thymidinu- ^{14}C , resp. ^3H na thymidin-5'-mono-, di- a trifosfát (Bollum, F. J. a Potter, V. R., *Cancer Research* **19**, 561 (1959); Weissman, S. M., Smellie, R. S. M. a Paul J., *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 101 (1960); Bianchi, P. A., Crathorn, A. R. a Shooter, K. V., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 728 (1962); Kára, J. a Šorm F., *Coll. Czech. Chem. Commun.* **28**, 1441 (1963); Baugnet-Mahieu, L., Gountier, R. a Semal, M., *J. Labelled Compounds*, **II**, 77 (1966); Veselý, J., Čihák, A., a Šorm, F., *Coll. Czech. Chem. Commun.* **33**, 341 (1968).

Je výhodou těchto postupů, že konverse radioaktivního thymidinu na nukleotidy thyminu probíhá v jediném stupni. Za nevýhodné lze považovat, že a) reakce nejsou specifické a zpravidla vzniká směs radioaktivních nukleotidů a b) synthosa radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu touto cestou je v delším časovém údobí málo reprodukovatelná v důsledku významné biologické variability zdrojů enzymových preparátů. S ohledem na předmětný vynález se i použití thymidinu místo thyminu jako radioaktivního substrátu jeví jako málo výhodné.

Jiným biologickým systémem, který přichází pro přípravu radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu v úvahu, jsou bakterie *Escherichia coli*. Je například popsán obecný způsob biosynthosy základních nukleosid-5'-fosfátů značených radioisotopem ^{32}P bakteriemi *Escherichia coli* B *in vivo* (Hurlbert, R. B. a Furlong, N. B. v *Methods in Enzymology*, Vol. XII, A, str. 193—202, Acad. Press, New York-London, 1967). Tento způsob je však zcela specifický pro přípravu nukleotidů značených radioisotopem ^{32}P , kdy zdrojem radioaktivity je ^{32}P -orthofosfát, přítomný jako esenciální složka v živném roztoku. Exogenní thymin se jako substrát pro synthosu desoxyribonukleové kyseliny ve většině kmenů *Escherichia coli* i dalších nedá využít (Rachmeler, M., Gerhart, J. a Rosner, J., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 222 (1961); Bodmer, W. F. a Grether, S., *J. Bacteriol.* **89**, 1011 (1965)). Jeho minimální inkorporace do buněčné desoxyribonukleové kyseliny se dá podstatněji zvýšit pouze v pří-

tomnosti nadbytku purinových desoxyribonukleosidů v živých roztocích [Kammen, H. O., *Biochim. Biophys. Acta* **134**, 301 (1967)]. V citovaných postupech však vždy probíhá intenzivní biosynthosa endogenního (a tudíž neradioaktivního) thyminu, což má nutně za následek vysoce nežádoucí hluboký pokles specifické radioaktivity thymidinových nukleotidů v desoxyribonukleové kyselině.

Všechny dosud zmíněné nevýhody známých postupů odstraňuje předmětný vynález způsobu přípravy radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu značeného specificky nebo nespecificky isotopem ^{14}C , resp. ^3H kultivací speciálního kmene *Escherichia coli* SPT⁻, dependentního na thymin, v přítomnosti exogenního radioaktivního thyminu, kvantitativní inkorporací radioaktivního thyminu do buněčné desoxyribonukleové kyseliny a následnou izolací radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu z takto specificky označené desoxyribonukleové kyseliny kombinací degračních chemických a enzymatických procesů a isolačních postupů, umožňujících vysoký výtěžek produktu a bránících degradaci radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu, jehož podstata spočívá v tom, že se použije speciálního kmene bakterií *Escherichia coli* SPT⁻, dependentního na thymin, za optimálních podmínek jeho kultivace v syntetickém živném médiu, při koncentraci radioaktivního thyminu v médiu 0,8 až 1,2 $\mu\text{g/ml}$, a tato živná půda se inokuluje 0,8 až 1,2 % bakteriální kultury téhož kmene, vypěstované na médiu s radioaktivním thyminem, přičemž specifická radioaktivita výchozího substrátu a konečného produktu jsou identické. Použitý speciální kmen *Escherichia coli* dovoluje využití radioaktivního thyminu pro synthosu buněčné desoxyribonukleové kyseliny ve vysoké míře. Tato inkorporace radioaktivního thyminu do bakterií zmíněného kmene se navíc provádí za definovaných a předem vyhledaných podmínek tak, aby využití radioaktivního substrátu bylo absolutní.

Při kultivacích se používá limitního množství inokula buněk speciálního kmene, vypěstovaných na médiu a radioaktivním thyminem- ^{14}C , resp. ^3H . Specifická radioaktivita výchozího substrátu a konečného produktu je pak identická a odlišnosti jsou jen důsledkem chyb měření radioaktivity, resp. hmoty preparátů.

Předmětný vynález dále volí takový způsob zpracování radioaktivní biomasy degračními chemickými a enzymatickými postupy, že thymidin-5'-monofosfát- ^{14}C , resp. ^3H lze izolovat ve vysokém výtěžku jako jediný reakční produkt thyminu.

Zatímco dosud známé metody přípravy thymidin-5'-monofosfátu jsou zatíženy nežádoucí velkou variabilitou enzymových preparátů je námi vypracovaný postup reprodukovatelný zcela spolehlivě s vysokou výtěžností požadovaného preparátu.

V dalším je vynález objasněn v příkladech provedení, aniž se na tyto výlučně omezuje.

Příklad 1

Kultivace bakterií speciálního kmene *Escherichia coli* SPT⁻, v živném syntetickém roztoku v přítomnosti exogenního thyminu-2-¹⁴C

Sterilní živný roztok vhodného složení [Škoda, J., Hess, V. F. a Šorm, F., Coll. Czech. Chem. Commun 22, 1330 (1957)] o objemu 1250 ml byl zaočkován 10 ml inokula bakterií speciálního kmene *Escherichia coli* SPT⁻ a přidány 2 ml sterilního vodného

roztoku (0,55 mCi) thyminu-2-¹⁴C o specifické aktivitě 44,0 mCi/mmol. Kultivace byla provedena stacionárně při 37 °C po dobu 16 až 18 hodin. Bakteriální suspenze byla pak odstředěna při 5 °C a 4000 x g během 30 minut. Čirá, slabě nažloutlá supernatantní frakce byla odstraněna, sediment resuspendován v destilované vodě a suspenze znovu odstředěna. Ve spojených supernatantních frakcích byla stanovena radioaktivita ¹⁴C. Stupeň utilizace radioaktivního thyminu je patrný srovnáním výsledků několika pokusů provedených v preparativním měřítku (viz tab. 1).

Tabulka 1

Inkorporace exogenního thyminu-2-¹⁴C do buněk bakterií *Escherichia coli* SPT⁻, při jejich kultivaci v syntetickém živném roztoku

Pokus	Objem živného roztoku ml	Doba kultivace hod.	Stupeň inkorporace thyminu-2- ¹⁴ C do biomasy*] %
1	1250	16	96,2
2	1250	17	94,0
3	1250	16	96,0
4	1250	18	95,7

*) Stupeň inkorporace radioaktivního thyminu-2-¹⁴C je vyjádřen v procentech celkové radioaktivity ¹⁴C exogenního thyminu-2-¹⁴C na počátku kultivace.

Příklad 2

Isolace thymidin-5'-monofosfátu-2-¹⁴C z bakterií *Escherichia coli* SPT⁻ značených specificky v buněčné desoxyribonukleové kyselině isotopem ¹⁴C

Při izolaci radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu-2-¹⁴C v preparativním měřítku byly v jediném pokusu zpracovány bakteriální suspenze kmene *Escherichia coli* SPT⁻ ze čtyř „standardních“ kultivací, provedených způsobem uvedeným v příkladu 1.

Celkový objem 18,0 ml vlhké váhy bakterií byl zpracován následujícím způsobem (viz Schéma): Bakterie byly dvakrát po sobě promyty 50 ml destilované vody a zbaveny tak zbytků složek živného roztoku. Promytý sediment bakterií byl suspendován ve 30 ml 1N roztoku hydroxidu draselného a inkubován při 37 °C po dobu 20 hodin. Tím byla veškerá buněčná ribonukleová kyselina hydrolysována na ribonukleosid-2',3'-monofosfáty. Kyselinou solnou bylo pH suspenze upraveno na hodnotu 8; celkový objem suspenze tím vzrostl na 50 ml. Suspenze pak byla dialysována dvakrát proti 4 l destilované vody, a to vždy při teplotě 4 °C a po dobu 20 hodin. V dialysačním roztoku nebyla detegována žádná radioaktivita ¹⁴C. Přidáním Tris-HCl pufru k dialysátoru byl vy-

tvořen jeho 0,2 N roztok v tomto pufru o pH 8; pak byl přidán ještě síran hořečnatý tak, aby výsledná koncentrace této soli v roztoku byla 0,003 %. V přítomnosti 5 mg desoxyribonukleasy I (Worthington Biochemical Corp., USA) byl pak roztok inkubován při 37 °C po dobu 16 hodin. Hodnota pH roztoku pak byla přidáním pevného Tris-HCl pufru upravena na hodnotu 9,8; v přítomnosti 1,2 ml (1,2 mg) glycerinového roztoku fosfodiesterasy z hadího jedu (C. F. Boehringer and Soehne, GmbH, NSR) byla provedena enzymová hydrolyza přítomných oligodesoxyribonukleotidů na desoxyribonukleosid-5'-monofosfáty, a to při 37 °C během 4 hodin. Enzymový hydrolyzátní roztok byl pak v zatavených ampulích prudce zahřát na 100 °C po dobu 10 minut na vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly denaturované enzymové preparáty a bakteriální buněčné proteiny odstraněny odstředěním při 10 000 x g při 10 °C po dobu 20 minut.

Objem supernatantní frakce byl redukován mrazovou sublimací na 8 ml; vyloučené neradioaktivní látky byly odstraněny odstředěním za stejných podmínek jako v předchozí operaci. Čirá, silně opaleskující supernatantní frakce byla pak chromatografována na papíře Whatman č. 3 v soustavě n-butylalkohol : kyselina octová : voda (5 : 4 : 1) v sestupném uspořádání při laboratorní teplotě po dobu 16 hodin. Autoradiografickou detekcí byla identifikována pouze jediná radioaktivní látka, odpovídající thymidin-5'-monofosfátu-2-¹⁴C. Po eluci thymidin-5'-monofosfátu-2-¹⁴C byla provedena jeho re-

chromatografie v témže rozpouštědlovém systému. Radiochemická čistota látky byla kvalitativně ověřena papírovou chromatografií ve dvou rozpouštědlových soustavách:

a) n-butylalkohol : kyselina octová : voda (5 : 4 : 1).

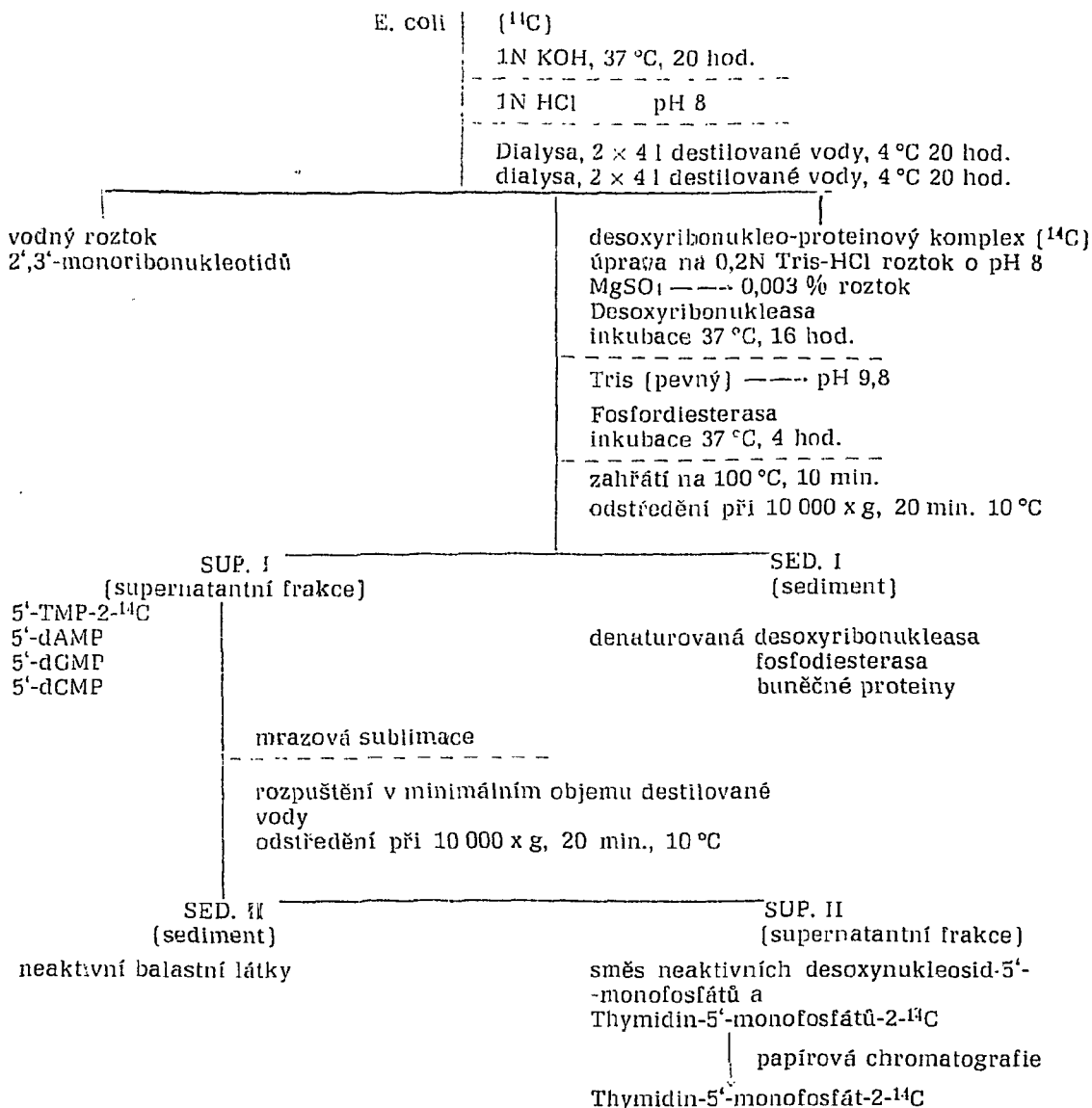
b) kyselina isomáselná : voda/hydroxid amonný (66 : 33 : 1,5).

Zhodnocením chromatografických a elektroforetických analýz thymidin-5'-monofosfátu-2-¹⁴C (elektrolýza byla provedena v 0,05 M triethylamonium bikarbonátu při pH 7,5 a potenciálním spádu 35 V [cm] bylo zjištěno, že jeho radiochemická čistota je

vyšší než 98 %. Spektrofotometrická analýza potvrdila nepřítomnost dalších neaktivních látek. Specifická aktivita thymidin-5'-monofosfátu-2-¹⁴C určená spektrofotometrickým stanovením hmoty a scintilačním změřením radioaktivity ¹⁴C byla 43,3 mCi/mmol. Celková radioaktivita stanovená v supernatantní frakci (SUP I) po odstranění zdenaturovaných buněčných proteinů a enzymových preparátů byla 92,3 % radioaktivity ¹⁴C thyminu-2-¹⁴C vloženého do reakce. Při každé další operaci spojené s čištěním thymidin-5'-monofosfátu-2-¹⁴C došlo přibližně k 5 % ztrátám radioaktivity ¹⁴C.

Schéma

Isolace radioaktivního thymidin-5'-mono-fosfátu-2-¹⁴C z buněčné suspence bakterií speciálního kmene Escherichia coli SPT



PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu značeného specificky nebo nespecificky isotopem ^{14}C , popřípadě ^3H kultivací speciálního kmene *Escherichia coli* SPT⁻, dependentního na thymin, v přítomnosti exogenního radioaktivního thyminu, kvantitativní inkorporací radioaktivního thyminu do buněčné desoxyribonukleové kyseliny a následnou izolací radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu z takto specificky označené desoxyribonukleové kyseliny kombinací degradačních chemických a enzymatických procesů a isolačních postupů, u-

možňujících vysoký výtěžek produktu a bránících degradaci radioaktivního thymidin-5'-monofosfátu, vyznačený tím, že se použije speciálního kmene bakterií *Escherichia coli* SPT⁻, dependentního na thymin, za optimálních podmínek jeho kultivace v syntetickém živném médiu, při koncentraci radioaktivního thyminu v médiu 0,8 až 1,2 $\mu\text{g/ml}$, a tato živná půda se inokuluje 0,8 až 1,2 % bakteriální kultury téhož kmene, vypěstované na médiu s radioaktivním thyminem, přičemž specifická radioaktivita výchozího substrátu a konečného produktu jsou identické.