



УДК 547.361/418'44*3.05

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ
ИЗОПЕНТЕНИЛПИРОФОСФАТА

Богачева Е. Н., Жуков Н. Д., Шишков А. В.,
Гуляева Н. А. *, Шестаков А. С. *, Сосновская Н. Г. *,
Мочалова Л. В. *, Евдокимова О. А. *, Моисеев В. В. *

Институт химической физики Академии наук СССР, Москва;

*Воронежский филиал Всесоюзного научно-исследовательского института
синтетического каучука, Воронеж

Действием термически активированного трития получен меченый изопентенилпирофосфат с удельной радиоактивностью 3,0 ГБк/ммоль. Меченый изопентенилпирофосфат активен в ферментативном синтезе олигопреолов *in vitro*.

Изопентенилпирофосфат (ИРР) — «активированный изопрен» — и его аналоги являются мономерами в ферментативном синтезе *in vivo* изопреноидных соединений: терпенов, полипреолов, каучука, гутты и др. [1, 2]. Определение ферментативной активности и изучение молекулярного механизма действия пренилтрансфераз, одним из субстратов которых является ИРР, на данном этапе возможно только при использовании меченого препарата последнего [3].

В настоящее время для синтеза меченого ИРР используются как биохимические, так и химические методы. Первые требуют наличия ферментативной системы и меченого препарата *D, L*-мевалоновой кислоты [3]. Вторые, основанные на синтезе радиоактивного изопентенола и его дальнейшем многостадийном фосфорилировании [4–6], сопряжены с большими экспериментальными трудностями.

Метод термической активации трития [7] позволяет ввести метку непосредственно в молекулу ИРР. Метод по праву считается экспрессным и неоднократно использовался для введения тритиевой метки в биологически активные соединения [7–10]. Принцип метода и установка описаны ранее [7]. Атомарный тритий образуется при каталитической диссоциации $^3\text{H}_2$ на разогретой до 2000 К вольфрамовой ленте. В качестве мишеней использовали тонкие пленки замороженных при 77 К (жидкий азот) водных растворов ИРР. Тритиевую метку вводили в ИРР при давлении трития 10^{-2} мм рт. ст. Время эксперимента 10–30 с. Радиоактивную воду и основную часть обменоспособного лабильного трития удаляли лиофилизацией водных растворов препарата.

Исходный ИРР был синтезирован по методу Донниджера и Поньяка [5] двухстадийным фосфорилированием изопентенола. Конечный продукт анализировали ТСХ на РЕИ-целлюлозе в 0,5 М LiCl. Полученное в результате синтеза вещество представляло собой органический фосфат [11] и имело подвижность (R_f 0,4), соответствующую трехзарядному иону с молекулярным весом больше, чем у неорганического ортофосфата (R_f 0,55), и меньше, чем у геранилпирофосфата* (R_f 0,27). Небольшие

Сокращения: ИРР — изопентенилпирофосфат $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{PP}$; IAPP — изоамилпирофосфат $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{PP}$; DMAPP — диметилалилпирофосфат $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{PP}$; IMP — изопентенилмонофосфат $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{P}$; GPP — геранилпирофосфат $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{PP}$; РЕИ-целлюлоза — полиэтиленминцеллюлоза.

* Синтез свидетелей для ТСХ (GPP — трехзарядного аниона, увеличенного по сравнению с ИРР на одно изопентенильное звено, и IAPP — гидрированного аналога ИРР) приведен в «Экспериментальной части».

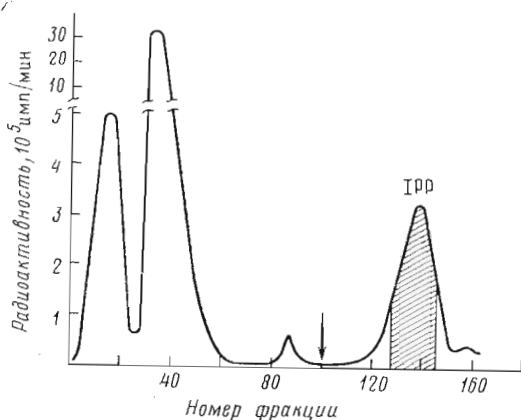


Рис. 1

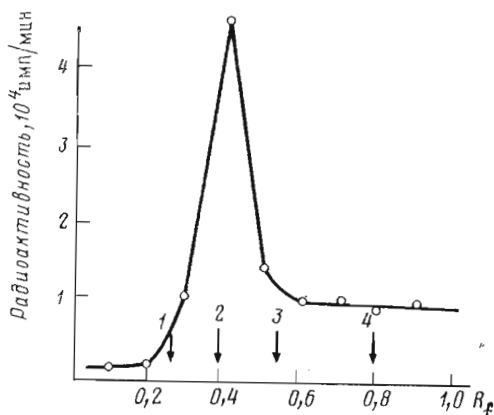


Рис. 2

Рис. 1. Выделение $[^3\text{H}]\text{IPP}$ на колонке ($1,5 \times 45$ см) с DEAE-целлюлозой (NH_4HCO_3 , объем 1 л, $0,03\text{--}0,3$ М, pH 7,8). Объем фракций 7 мл; стрелкой показано место подключения градиента

Рис. 2. Анализ очищенного $[^3\text{H}]\text{IPP}$ ТСХ на PEI-целлюлозе в $0,5$ М LiCl. Стрелками показано положение свидетелей: IAPP (1), IPP (2), Na_2PO_4 (3), IMP (4)

Рис. 3. ТСХ на силуфоле продуктов инкубации $[^3\text{H}]\text{IPP}$ с бесклеточным экстрактом *Pisum sativum*. Стрелками показаны места выхода свидетелей: фарнезола (1) и гераниола (2). I — трехзвенный олигопептол, II — двухзвенный олигопептол

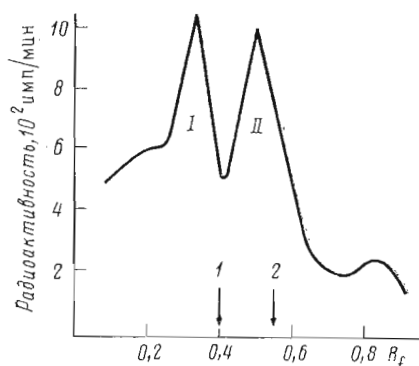


Рис. 3

примеси изопентенилмонофосфата (IMP, R_f 0,8), продукта гидролиза IPP при длительном хранении, и ортофосфата удаляли с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе. В результате очистки получили индивидуальный продукт. В него вводили метку по вышеописанному методу.

Анализ полученного меченого препарата на пластинках с тонким слоем PEI-целлюлозы показал, что меченый продукт, соответствующий IPP, включает 8—10% всей радиоактивности, а ~80% тритиевой метки обнаруживается в веществе, совпадающем по подвижности с IMP (R_f 0,8). Аналитическая ионообменная хроматография образца на колонке с DEAE-целлюлозой дала аналогичные результаты: во фракциях, соответствующих выходу двух- и трехзарядных ионов, обнаружено 69 и 8% меченого материала.

Однако априори можно было ожидать, что трехзарядный меченый материал содержит не только IPP, но и IAPP (продукт присоединения атомов ^3H по двойной связи) и DMAPP (продукт изомеризации IPP). Для проверки этой гипотезы из всего меченого препарата ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе выделяли фракции, соответствующие трехзарядным ионам (рис. 1). Вещество было индивидуально и совпадало, по данным ТСХ в $0,5$ М LiCl (рис. 2), с IPP (R_f 0,4). Примесей IAPP (R_f 0,25) обнаружено не было. Анализ этого же элюата в тонком слое PEI-целлюлозы в системе Б (см. «Экспериментальную часть») показал, что меченый материал не содержит DMAPP (R_f 0,7) и является изопентенилпирофосфатом (R_f 0,05) [12]. Полученные результаты подтверждают данные о нестабильности продуктов изомеризации IPP [5, 12—14]. Результаты свидетельствуют о том, что в процессе «бомбардировки» тритием

изопентенилпирофосфата самым «слабым» звеном в его молекуле является связь P—O—P, в углеродном скелете реакции не обнаружено. Сохранение двойной связи в IPP в условиях реакции с атомами ^3H можно объяснить экранированием двойных связей метильными радикалами и/или возникновением определенной ориентации дифильных молекул изопентенилпирофосфата на поверхности замороженного раствора-мишени.

Для проверки биологической активности [^3H]IPP использовали ферментативную систему синтеза олигопептидов, полученную из трехдневных проростков гороха *Pisum sativum* [15]. По предварительным данным, инкубация [^3H]IPP с грубым гомогенатом гороха приводит к включению метки в кислотолабильную гексанрастворимую фракцию. Продуктами реакции, по данным ТСХ на силуфоле [16], являются двух- и трехзарядные олигопептиды с R_f 0,5 и 0,33 (рис. 3). Для идентификации были использованы гераниол (R_f 0,55) и фарнезол (R_f 0,41).

Таким образом, бомбардировка IPP пучком активированных атомов трития с последующей очисткой меченого материала позволяет получить [^3H]IPP, активный в ферментативной системе *in vitro*. Меченый тритием IPP может быть использован для изучения молекулярных механизмов синтеза изопреноидных соединений.

Экспериментальная часть

В работе использовали гераниол (*транс*-3,7-диметилоктадиен-2,6-ол-1, Serva, ФРГ), фарнезол (3,7,11-триметилдодекатриен-2,6,10-ол-1, Fluka, ФРГ), ацетонитрил (Merck, ФРГ), 10% водный раствор гидроокиси тетрабутиламмония (Chemapol, ЧССР), тетразамещенный пирофосфат натрия (Koch-Light Labors, Англия). Остальные реактивы отечественного производства.

Трис (тетра-*n*-бутиламмоний) гидропирофосфат получали нейтрализацией пирофосфорной кислоты, образовавшейся при пропускании $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ через дауэкс $50\text{W}2(\text{H}^+)$, гидроокисью тетра-*n*-бутиламмония до pH 7. Водный раствор лиофилизовали досуха.

Изоамилпирофосфат синтезировали из изоамилбромида фосфорилированием трис (тетра-*n*-бутиламмоний) гидропирофосфатом в ацетонитриле. Очистку проводили методом ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе.

Ионообменную хроматографию в аналитическом и препаративном варианте проводили на колонках с DEAE-целлюлозой (DEAE-52, Serva, ФРГ), используя для сбора фракций и регистрации поглощения (206 нм) автоматическую систему для гель-фильтрации (ЛКВ, Швеция). В аналитическом варианте использовали колонку размером 0,4×1 см и элюцию раствором NaCl (объем 100 мл) в градиенте концентраций 0,04—0,2 М. Для измерения распределения радиоактивности водных фракций использовали диоксидный сцинтиллятор.

ТСХ проводили на пластинках с PEI-целлюлозой (Merck, ФРГ) размером 5×7 см в системах А (0,5 М LiCl с последующей промывкой пластины этанолом в течение 1 ч) и Б (изопропанол — изобутанол — аммиак — вода, 40 : 20 : 1 : 39). Препаративную ТСХ для выделения индивидуальных продуктов осуществляли на пластинках (6×9 см) с толстым слоем PEI-целлюлозы (1,2 г носителя в 5 мл воды на пластину) в 0,2 М NH_4HCO_3 , pH 7,9 (В).

Зоны, содержащие фосфаты, обнаруживали опрыскиванием хроматограмм 0,1 н. раствором HCl, содержащим 1% молибдата аммония и 6% HClO_4 [11].

Для измерения распределения радиоактивности на хроматограммах их разрезали на горизонтальные зоны по 0,4 см и считали радиоактивность зон в толуольном сцинтилляторе.

Радиоактивность проб измеряли на жидкостных сцинтилляционных счетчиках Mark-II (США) и Rac-Beta 1215 (ЛКВ, Швеция).

Синтез IPP. Технический изопентенол (3-метилбутен-3-ол) сушили 2 сут над безводным Na_2SO_4 . Перегоняли и собирали фракцию с т. кип.

129—130° С. IPP получали из изопентенола по методике [5] реакцией с POCl_3 в присутствии морфолина и последующим фосфорилированием морфолидата IMP фосфорной кислотой. Большую часть неорганического фосфора удаляли при добавлении водного раствора LiOH. Индивидуальный продукт выделяли очисткой литиевой соли IPP колоночной ионообменной хроматографией, анализировали методом ТСХ на PEI-целлюлозе в системе А.

Синтез изоамил- и геранилпирофосфата проводили по методике [17]. К 154 мг (1,0 ммоль) гераниола в 10 мл сухого пентана добавляли 80 мкл (0,9 ммоль) трехбромистого фосфора при постоянном перемешивании при 0° С. Через 10 мин добавляли 4—5 капель метапола, не прекращая встряхивать. Полученную смесь промывали водой и 10% NaHCO_3 , высушивали над безводным MgSO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в 6 мл безводного ацетонитрила, добавляли 1,4 г (1,5 ммоль) трис(тетра-*n*-бутиламмоний)гидрофосфата и оставляли реакционную смесь на 24 ч при слабом перемешивании. Из реакционной смеси удаляли ацетонитрил отгонкой в вакууме, остаток растворяли в 100 мл NH_4HCO_3 , pH 7,8, и хроматографировали на колонке (1,2×30 см) с DEAE-целлюлозой (см. очистку [^3H]IPP). Индивидуальный продукт получали, используя препаративную ТСХ в системе В. Геранилпирофосфат хранили на пластинках при -24° С [12]. Перед употреблением слой целлюлозы отделяли, вещество смывали буферным раствором, супернатант лиофилизировали и анализировали ТСХ в системе А.

Введение тритиевой метки в IPP. 0,2 г литиевой соли IPP растворяли в минимальном количестве (2 мл) водного раствора NaOH, pH 8,0, и замораживали раствор в виде тонкой пленки на внутренней поверхности реакционного сосуда, охлаждаемого жидким азотом. Реактор присоединяли к установке и вакуумировали до остаточного давления 10^{-4} — 10^{-5} мм рт. ст., после чего через палладиевый натекагель подавали тритий до давления 10^{-2} мм рт. ст. Давление трития измеряли термомпарным датчиком, отградуированным по водороду. Расход газообразного трития ~7,0 ГБк.

Реакционный сосуд термостатировали жидким азотом. Диссоциация молекулярного трития $^3\text{H}_2$ протекала на поверхности вольфрамовой нити при ее нагреве электрическим током до температуры 2000 К. Время экспозиции составляло 10—30 с. Непрореагировавший и сорбированный на стенках аппаратуры тритий удаляли вакуумированием системы в течение 30 мин. Для удаления лабильного трития в работе использовали многократную лиофилизацию водного раствора меченого препарата с контролем за полнотой отделения лабильного трития по изменению радиоактивности проб после каждой лиофилизации.

Количественный анализ IPP, меченого тритием, проводили по методике [18]. Поглощение проб регистрировали при 830 нм на спектрофотометре Perkin — Elmer.

Очистка [^3H]IPP. Меченый материал разбавляли 100 мл охлажденного до 10° С буфера: 0,03 М NH_4HCO_3 , pH 7,8 (стартовый буфер), и наносили на колонку (1,5×45 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной тем же буфером.

Ионообменную хроматографию проводили при температуре не выше 10° С во избежание изменения pH бикарбонатного буфера. Элюцию (скорость 1 мл/мин) проводили стартовым буфером, а затем линейным градиентом концентраций 0,03—0,3 М NH_4HCO_3 , pH 7,8 (600 мл). Собирали фракции по 7 мл, определяли в них содержание меченого материала, и отбирали фракции, соответствующие трехзарядным ионам.

В очищенном препарате содержалось 5 мг NH_4 -соли IPP. Химический выход составил 2,5%, радиохимический — 1,37% (45 МБк). Удельная радиоактивность препарата 3,0 ГБк/ммоль.

Очистку геранилпирофосфата и изоамилпирофосфата проводили так же.

Проверка [^3H]IPP проводилась в ферментативной системе *in vitro*. Получение бесклеточного экстракта из трехдневных проростков гороха и его инкубацию с [^3H]IPP осуществляли как описано в работе [15]. Об-

разовавшиеся меченые аллильные спирты экстрагировали гексаном. Гексановую фракцию упаривали и продукты реакции анализировали методом ТСХ на обращенной фазе [16]. Использовали пластинки силуфол (Cavalier, ЧССР), пропитанные 5% жидким парафином. Спирты обнаруживали в парах вода. Разделение проводили в системе метанол — вода, 4:1. Для измерения радиоактивности хроматограмму делили на зоны, разрезали и считали в толуольном сцинтиллаторе. Для контроля проводили инкубацию [³H]IPP в тех же условиях эксперимента, но в отсутствие фермента.

Авторы выражают благодарность А. М. Копылову, В. А. Друце (ЦНИИ им. А. Н. Белозерского, МГУ), Ю. А. Шабалину (ИБФМ АН СССР) и Ю. М. Марчеву (В. ф. ВНИИСК) за предоставленные реактивы и ценные рекомендации, В. Р. Гостеву (В. ф. ВНИИСК) за постоянную техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Beutia E. D., Porter J. W.* Annu. Rev. Biochem., 1976, v. 46, p. 113-142.
2. Физиология и биохимия растений-каучуконосов. Сб. статей/Ред. Гусев М. В., Бутенко Р. Г. М.: Изд-во МГУ, 1969, 173 с.
3. *Holloway D. V., Popjak G.* Biochem. J., 1967, v. 104, № 1, p. 57-70.
4. *Yuan C., Bloch K. J.* Biol. Chem., 1959, v. 242, № 5, p. 1605-1608.
5. *Donninger C., Popjak G.* Biochem. J., 1967, v. 105, № 2, p. 545-547.
6. *Parker T. S., Popjak G., Sutherland K., Wong S. M.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 530, № 1, p. 24-34.
7. *Шишков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольданский В. И., Песмянова Ан. Н.* Докл. АН СССР, 1976, т. 228, № 5, с. 1237-1239.
8. *Каширин И. А., Гедрович А. В., Шишков А. В., Каграманова В. К., Баратова Л. А.* Биорган. химия, 1983, т. 9, № 11, с. 1531-1534.
9. *Нейман Л. А., Оноприенко В. В., Смоляков В. С., Сейфер В. С., Третьякова С. Ю., Хохлов А. С.* Биорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 116-120.
10. *Нейман Л. А., Антропова Л. П., Коцун П. П., Чепелев В. М., Назаров Е. И.* Биорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 121-123.
11. *Hanes C. S., Isperwood J. A.* Nature, 1949, v. 164, № 4183, p. 1107-1112.
12. *Logan D. M. J.* Lipid Res., 1972, v. 13, № 1, p. 137-138.
13. *Tidd B. K. J.* Amer. Chem. Soc., 1971, В, № 6, p. 1168-1176.
14. *Шибарова Э. А., Богданов А. А.* В кн.: Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978, с. 123-163.
15. *Allen B. E., Vanthopre D. V.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 1, p. 35-40.
16. *Green T. R., West C. A.* Biochemistry, 1974, v. 13, № 23, p. 4720-4729.
17. *Dixit V. M., Laskovics F. M., Noall W. L., Poulter C. D. J.* Org. Chem., 1981, v. 46, № 9, p. 1967-1969.
18. *Gertlach E., Denticke B.* Biochem. Z., 1963, В. 337, № 7, S. 477-479.

Поступила в редакцию
5.XII.1984
После доработки
29.III.1985

PREPARATION OF TRITIUM-LABELED ISOPENTENYLPIROPHOSPHATE

BOGACHEVA E. N., ZHUKOV N. D., SHISHKOV A. V., GULYAEVA N. A. *,
SHESTAKOV A. S. *, SOSNOVSKAYA N. G. *, MOCHALOVA L. V. *,
EV'DOKIMOVA O. A. *, MOISEEV V. V. *

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
**Voronezh Branch of the All-Union Research Institute of Synthetic Rubber,*
Voronezh

Labeled isopentenylpyrophosphate having the specific activity of $3.0 \cdot 10^{12}$ Bk/mol has been prepared using thermally activated tritium. The labeled compound is active in the in vitro enzymatic synthesis of oligoprenols.