

## Notizen

### **Über Direktmarkierungen mittels der Reaktion $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$ : Mikrobielle Gewinnung radio- chemisch reiner Verbindungen aus bestrahlten Purin- und Benzimidazol-Basen**

Direct Labeling by Means of  $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$ : Microbial Production of Radiochemical Pure Compounds with Irradiated Purine and Benzimidazole Bases

Otto Müller, Meric Alkan und Ursula Rapp

Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung, Universität Stuttgart

Herrn Prof. Dr. H. Bredereck zum 70. Geburtstag gewidmet

(Z. Naturforsch. **29 c**, 633–634 [1974]; eingegangen am 6. Juni 1974)

#### **$^{14}\text{C}$ -labeling, Neutron Irradiation**

$^{14}\text{C}$ -labeling by means of neutron irradiation of nitrogen containing heterocyclic compounds such as benzimidazoles and purines has been studied. The isolation of radiochemical pure compounds was realised by a microbiological method using *P. shermanii*. This microorganism utilizes benzimidazoles and purines for the base moiety of vitamin  $\text{B}_{12}$  analogues, which were isolated and degraded. Microbiological methods seem to provide an excellent tool not only for checking specific radioactivity but also for the isolation of radiochemical pure compounds.

Die Rückstoß-Direktmarkierung mit  $^{14}\text{C}$ , die durch Neutronen-Bestrahlung stickstoff-haltiger oder mit einer Stickstoff-Quelle vermischter organischer Verbindungen möglich ist<sup>1, 2</sup>, erfordert relativ lange Reaktor-Bestrahlungen. Ursache hierfür sind die lange Halbwertszeit des  $^{14}\text{C}$  und der kleine Wirkungsquerschnitt der Reaktion  $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$ . Bei der Neutronen-Bestrahlung im Reaktor erhalten die Proben sehr hohe Dosen ionisierender Strahlen, die zur strahlenchemischen Bildung zahlreicher Umwandlungsprodukte führen. Ein Teil dieser Verbindungen tritt dabei in sehr kleinen Mengen aber mit hoher spezifischer Aktivität auf. Zur Isolierung der radiochemisch reinen Substanzen eignen sich daher nur Methoden mit außergewöhnlich guten Trenneffekten. Diese Bedingung ist bei dem im folgenden beschriebenen Verfahren der gärungs-chemischen Reinigung erfüllt.

Bei der Reaktor-Bestrahlung stickstoff-haltiger Heterocyclen erhielten wir sehr komplexe Mischun-

gen  $^{14}\text{C}$ -markierter Verbindungen. Purin- und Benzimidazol-Derivate, die von bestimmten Mikroorganismen zum Aufbau von Cobamiden verwertet werden<sup>3</sup>, können über die biologische Bildung dieser Verbindungen in radiochemisch reiner Form erhalten werden. Dies ist für die Beurteilung der Bestrahlungseffekte sowie für die Anwendbarkeit der erhaltenen  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanzen von grund-sätzlicher Bedeutung. Das Prinzip des Reinigungsverfahrens, dem bei bestimmten Verbindungen auch andere gärungs-chemische Prozesse zugrunde gelegt werden können, besteht darin, daß man dem Fermentationsmedium des betreffenden Mikroorganismus, z. B. *Propionibacterium shermanii*, die bestrahlte Probe zusetzt und die Cobamide nach beendeter Fermentation aus dem Zellmaterial isoliert. Dabei erhält man die an den jeweiligen Basen-Bestandteilen  $^{14}\text{C}$ -markierten Cobamide in radiochemisch reiner Form. Der ausgezeichnete Trenneffekt dieses mikrobiologischen Verfahrens beruht auf der hohen Spezifität biochemischer Reaktionen.

Im Hinblick auf die Gewinnung der Basen in Form ihrer Nucleoside bzw. Nucleotide ist von besonderem Interesse, daß sich der nucleotidische Ligand der Cobamide auf verschiedene Weise abspalten läßt<sup>3</sup>. Durch Säure-Einwirkung können die  $^{14}\text{C}$ -markierten Basen erhalten werden. Sie lassen sich aber auch in Form der Nucleoside gewinnen, z. B. durch Hydrolyse in Gegenwart von Cer(III)-hydroxid. Für die Gewinnung der Benzimidazol-riboside eignet sich besonders die Einwirkung wasserfreier Flußsäure<sup>4</sup>, während die säurelabileren Cobamide der Purin-Reihe unter diesen Bedingungen bis zu den freien Basen abgebaut werden. Bei den Benzimidazol-cobamiden ist außerdem ein Abbau zu den Nucleotiden möglich.

Nur im Falle der gärungs-chemischen Reinigung von neutronen-bestrahltem Purin war das Cobamid außer an der nucleotidischen Base auch am Corrin-Ring  $^{14}\text{C}$ -markiert. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität von Purin mußte dieses daher aus Purin-cobamid<sup>5</sup> freigesetzt werden.

Bei manchen Organismen werden Purine zu Harnstoff + Glyoxylsäure abgebaut<sup>6</sup>. Es ist daher nicht auszuschließen, daß Purin-Kohlenstoff über die Stufen Glyoxylsäure, Glycin,  $\delta$ -Aminolävulinsäure und Porphobilinogen zur Biosynthese des Corrin-Ringes verwertet wird. Entsprechende Studien über den Abbau von Purin sind allerdings bei *Propionibacterium shermanii* noch nicht durchgeführt worden.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. O. Müller, Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart, D-7000 Stuttgart 80, Pfaffenwaldring 55.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Durch weitere Untersuchungen mit gärungchemisch gereinigtem Purin, das durch Neutronen-Bestrahlung mit  $^{14}\text{C}$  markiert wurde, soll geklärt werden, ob der Einbau von  $^{14}\text{C}$  in den Corrin-Ring auf eine Verwertung von Nebenprodukten der Bestrahlung oder auf einen teilweisen Purin-Abbau durch den Mikroorganismus zurückzuführen ist. Zur näheren Untersuchung eines evtl. Purin-Abbaues in *P. shermanii* stehen Verfahren zur spezifischen Markierung von Purin zur Verfügung<sup>7,8</sup>.

Die Rückstoß-Direktmarkierung mit  $^{14}\text{C}$  führt zu relativ geringen spezifischen Aktivitäten (s. Tab.), so daß sie zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit organischer Verbindungen nicht in Frage kommen dürfte. Sie ist jedoch zur Gewinnung größerer Mengen  $^{14}\text{C}$ -markierter Verbindungen von Interesse,

Tab. Rückstoß-Direktmarkierung von Purin- und Benzimidazol-Basen mit Hilfe der Reaktion  $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$ .

Bestrahlte Probe	Bestrahlung Dauer Neu- tronen- fluß [Tag]	spezifische Aktivität Roh- produkt [m $\mu$ Ci/ mg]	reines Produkt [ $\mu$ Ci/ mM]
	[n/cm <sup>2</sup> . sec]		
Benzimidazol	10	5 · 10 <sup>12</sup>	4,6
Benzimidazol	5	7 · 10 <sup>13</sup>	44,1
Benzimidazol (+10% Imidazol)	10	5 · 10 <sup>12</sup>	6,8
Purin	5	7 · 10 <sup>13</sup>	68,0
5,6-Dimethylbenz- imidazol	10	7 · 10 <sup>13</sup>	86,3
2,6-Diaminopurin	10	7 · 10 <sup>13</sup>	106,2

deren Markierung durch Synthese nicht möglich oder sehr aufwendig ist. Dazu wäre jedoch eine Optimierung der Rückstoß-Direktmarkierung mit Hilfe der Reaktion  $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$  erwünscht. Das oben beschriebene Verfahren führt rasch zu radiochemisch reinen Verbindungen. Es eignet sich daher für Versuchs-Serien zum Studium des Einflusses verschiedener Bedingungen der Rückstoß-Direktmarkierung (z. B. Moderierung mit Edelgasen, Anwendung tiefer Temperaturen zur Verminderung strahlenchemischer Sekundärreaktionen, N-Gehalt der Proben) auf die radiochemische Ausbeute der markierten Verbindungen.

<sup>1</sup> A. P. Wolf, Angew. Chem. **71**, 237 [1959].

<sup>2</sup> G. Stöcklin, Nukleonik **8**, 410 [1966].

<sup>3</sup> Literaturzusammenstellung: W. Friedrich und K. Bernhauer, Medizinische Grundlagenforschung (K. Bauer, ed.), Bd. **2**, p. 662, Thieme-Verlag, Stuttgart 1959.

<sup>4</sup> G. Müller u. O. Müller, Z. Naturforsch. **21 b**, 1159 [1961].

<sup>5</sup> K. Bernhauer, O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. **335**, 37 [1961].

### Beschreibung der Versuche

**Bestrahlungen.** Die Proben (jeweils 1 bis 2 g) wurden im Forschungsreaktor FR 2 der Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe, mehrere Tage (s. Tab.) einem thermischen Neutronenfluß von  $5 \cdot 10^{12}$  bzw.  $7 \cdot 10^{13} \text{ n/cm}^2 \cdot \text{sec}$  ausgesetzt. Die  $\gamma$ -Dosisleistung betrug dabei ca.  $1,5 \cdot 10^7$  bzw.  $7 \cdot 10^8 \text{ r/h}$ .

**Gärungs-chemische Reinigung.** Die Fermentationen wurden in 7 l-Ansätzen mit *Propionibacterium shermanii*, bei 2,6-Diaminopurin mit *Propionibacterium arabinosum* unter Verwendung eines bereits beschriebenen Mediums<sup>9</sup> bei 28 bis 30 °C durchgeführt. Nach der Beimpfung versetzte man mit 140 ml steriler 50-prozentiger Glucose-Lösung und 84 mg CoSO<sub>4</sub> (gelöst in 7 ml Wasser). Die Gärung wurde durch tägliche pH-Korrektur auf 6,8 mittels steriler, gesättigter Soda-Lösung und Zugabe von 140 ml steriler 50-prozentiger Glucose-Lösung in Gang gehalten. Am 3. Tag der Gärung wurden die für den Einbau in das Corrinoid vorgesehenen neutronen-bestrahlten Basen (150 – 200 mg), gelöst in wenigen ml Äthanol (bei Benzimidazol und 5,6-Dimethylbenzimidazol) bzw. verd. Salzsäure (bei Purin und 2,6-Diaminopurin) zugesetzt. Nach 10 Tagen wurde die Bakterienmasse abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Die aus den Zellen in der Cyano-Form isolierten Corriinoide reinigte man durch Phenolextraktion und trennte sie durch Papierchromatographie an Whatman 3 MM mit einer Mischung aus 100 Teilen wasserges. sek. Butanol, 1 Teil Eisessig und 0,1 Teil 10-prozentiger HCN-Lösung. Die Ermittlung der spezifischen Aktivität der Cobamide wurde durch spektrophotometrische Bestimmung der Cyano-cobamide ( $E_{\text{mol}}^{361 \text{ nm}} = 28,1 \cdot 10^3$ ) und Radioaktivitätsmessung mit dem Tri-Carb-Flüssigkeitsszintillationszähler vorgenommen. Die spezifische Aktivität der aus den Cobamiden nach bekannten Verfahren<sup>3,4</sup> gewonnenen Basen, Nucleosiden und Nucleotiden erfolgt in entsprechender Weise.

Der Gesellschaft für Kernforschung M.B.H., Karlsruhe, und dem Verband der Chemischen Industrie danken wir für die Unterstützung der Versuche.

<sup>6</sup> C. P. Berg and H. M. Kolenbrander, Comparative Biochemistry of Nitrogen Metabolism (ed. by J. W. Campbell), p. 865, Academic Press, London 1970.

<sup>7</sup> H. Bredereck, F. Effenberger, G. Rainer u. H. P. Schosser, Liebigs Ann. Chem. **659**, 133 [1962].

<sup>8</sup> H. Bredereck u. R. Sell, unveröffentlicht.

<sup>9</sup> G. Müller u. G. Bezold, Z. Naturforsch. **24 b**, 47 [1969].