

EIN VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MEHRFACH
MIT TRITIUM MARKIERTEM THYMIN BZW. THYMIDIN

U. Fleiß and J. Römer
Central Institute of Nuclear Research Rossendorf
Academy of Sciences of the GDR
DDR - 8051 Dresden, German Democratic Republic

SUMMARY

After a survey about the preparation of tritium labelled thymine and thymidine a new synthesis for the preparation of manifold labelled thymine respectively thymidine is given. 5-Formyluracil was reduced to 5-hydroxymethyluracil (5-HMU) in a phosphate buffer at pH 7,0 with tritium gas using PdO/BaSO₄ as catalyst. The tritium labelled 5-HMU was hydrogenated to [methyl-³H] thymine with tritium gas using a mixture of Palladium black and Palladiumchloride in dry dioxane. The specific activity was 2550 GBq/mmol. [methyl-³H] Thymidine was obtained in a usual enzymatic synthesis.

EINFÜHRUNG

Tritiummarkiertes Thymidin wird als spezifischer Tracer für die DNS verwendet und ist damit eines der wichtigsten tritiummarkierten Verbindungen. Am häufigsten wird es zu Untersuchungen der Zellkinetik und des Einbaus in die DNS eingesetzt [1]. Sehr gefragt ist dabei Thymidin mit

höchsten spezifischen Aktivitäten, um eine hohe Nachweisempfindlichkeit zu erreichen.

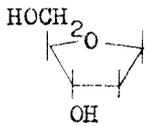
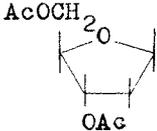
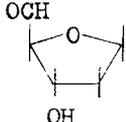
Erste Arbeiten über die Herstellung und Anwendung von tritiummarkiertem Thymin erschienen 1957 von Verly und Hunebelle [2] bzw. Taylor et al. [3]. In den letzten Jahren wurden recht unterschiedliche Herstellungsverfahren in der Literatur vorgestellt. Beispielsweise wurde versucht, Thymin bzw. Thymin durch Isotopenaustauschverfahren zu markieren. Die spezifischen Aktivitäten blieben jedoch auf einem relativ geringem Niveau. Wesentlich bessere Ergebnisse liefern die chemischen Verfahren. Durch chemische Verfahren lassen sich wesentlich höhere spezifische Aktivitäten erreichen und die Markierung ist positionspezifisch.

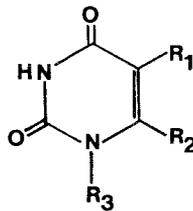
Die folgende Tabelle enthält einen Überblick über die bisher bekannten chemischen Verfahren zur Herstellung von tritiummarkiertem Thymin und Thymin. Im Formelschema sind die Ausgangsverbindungen dargestellt.

Bei den Methoden, die als Ausgangsprodukt 5-Formyluracil (V) benutzen, müßte eigentlich eine Doppelmarkierung der Methylgruppe zu erwarten sein. In einem Fall wurde nur eine Einfachmarkierung erreicht [5]. Von Pichat [10] wurden leider keine Reaktionsbedingungen angegeben, unter denen 5-Formyluracil zu doppeltmarkiertem Thymin umgesetzt werden kann. Wir beschäftigten uns deshalb mit der Synthese von mehrfach markiertem Thymin, das anschließend mittels einer bekannten enzymatischen Synthese zum Thymin umgesetzt wurde.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auch wir benutzten 5-Formyluracil als Ausgangsprodukt. Zunächst wurde versucht, mit $\text{Rh}/\text{Al}_2\text{O}_3$ als Katalysator, wie von Pichat [10] vorgeschlagen, und Tritiumgas 5-Formyluracil in einem salzsauren Medium zum Thymin zu reduzieren. Dabei stellten wir fest, daß neben Thymin erhebliche Mengen 5,6-Dihydrothymin entstehen und daß die spezifische Aktivität des Thymins nur einer Einfachmarkierung entsprach. Auf Grund dieses Ergebnisses tauschten wir den Katalysator gegen Pd/BaSO_4 aus. Auf Empfehlung sowjetischer Kollegen [15] wurde als Reaktionsmedium 0,01 n HCl verwendet. Wir beobachteten nach genügend langer Reaktionszeit (3 h) nur einen sehr unvollständigen Umsatz. Die spezifische Aktivität des Thymins betrug 1100 GBq/mmol. Es war also nur ein Tritiumatom pro Thyminmolekül eingebaut worden.

	R ₁	R ₂	R ₃	Verbindungen
	CH ₂ Cl	H	H	I
	CH ₃	J	H	II
	H	Cl	H	III
	S S	H	H	IV
	CHO	H	H	V
	CH ₂ OH	H		VI
	CH ₂ Br	H		VII
Formelschema der Ausgangsverbindungen	CH ₃	H		VIII



1	2	3	4	5	6
Ausgangs- verbindung, eingesetzte Menge [mg]	Reaktionsbedingungen		Pos ition der Markierung	spezifische Aktivität [GBq/mmol]	Lit.
	Reaktions- medium	Katalysator, Menge [mg]			
Verfahren zum ^3H -Thymin					
I, 256	15 ml 1,2-Dimethoxyethan	Pd/C (5 %)	methyl	103	4
I, 15	(CF_3CO) $_2\text{O}$ oder (CH_3CO) $_2\text{O}$	Pd/ BaSO_4 (5 %)	methyl	185 - 925	7
II, 15	1 ml MeONa- H_2O -Mi- schung	Pd/C (10%), 10	6	851	6
III ^x , 15	0,3 ml Dioxan, 50 μl Tri- ethylamin	Pd/C (10 %), 15	6	638	5
IV, 10	0,2 ml Dioxan	Raney-Nickel 250	methyl	450	8,9
V, 14	0,3 ml 0,1 n HCl	Pd/C (10 %), 15	methyl	1137	5
V		Rh/ Al_2O_3	methyl	1480	10
Verfahren zum ^3H -Thymidin					
VI, 10	75 μl Dioxan 25 μl Eisessig	Rh/ Al_2O_3 (5%) 20	methyl	1027	11
VI	H_2O + Eis- essig		methyl	555	10
VII, 200	10 ml Dioxan, 0,5 ml Tri- butylamin	Pd/C (10 %), 200	methyl	740	12,13
VIII	NaBT_4		5'	370	14
VIII, 10	0,2 ml Dioxan	Raney- Nickel 250	5'	545	8,9

^xDas Uracil wird nach der Markierung methyliert.

Die weiteren Untersuchungen zur Reduktion von 5-Formyluracil wurden mit Pd-Mohr als Katalysator durchgeführt. Als Reaktionsmedium diente uns Eisessig. Mit diesen Reaktionsbedingungen wurde zwar nach kurzer Reaktionszeit (20 min) ein vollständiger Umsatz zum Thymin erzielt, jedoch blieb die spezifische Aktivität noch unter 3/0 GBq/mmol. Nur unter Verwendung von vollständig deuterierter Essigsäure (CH_3COOD) und Deuteriumgas konnte gezeigt werden, daß mit diesen Bedingungen ein doppelt deuteriertes Thymin hergestellt werden kann^x. Schon beim Einsatz von Essigsäure mit einem D-Gehalt von 50 % sinkt der Deuterierungsgrad des Thymins unter den einer Einfachmarkierung. Aus diesen Untersuchungen mit Deuterium wird deutlich, daß zur Herstellung von Thymin mit 2 Tritiumatomen eine vollständig mit Tritium markierte Essigsäure notwendig wäre. Das schien uns aus verschiedenen Gründen nicht praktikabel.

Wie die beschriebenen Versuche zeigen, scheint das Medium einen entscheidenden Einfluß auf die spezifische Aktivität des Thymins auszuüben. Wir nehmen an, daß die Hydroxymethylgruppe des 5-Hydroxymethyluracils (5-HMU), das während der Reduktion als Zwischenprodukt entsteht, in einem sauren Medium stark zum Isotopenaustausch neigt. Auf Grund des Überschusses an leicht austauschbarem Wasserstoff im Lösungsmittel kommt es zu einer bedeutenden Erniedrigung der spezifischen Aktivität. Ist kein austauschbarer Wasserstoff vorhanden, wie im Experiment mit vollständig deuterierter Essigsäure, wird auch die Doppelmarkierung erzielt.

Diese gewonnenen Erkenntnisse führten uns zu völlig anderen Reaktionsbedingungen. Um das saure Medium zu umgehen, wurde in einem Phosphatpuffer bei pH 7,0 und PdO/BaSO_4 als Katalysator [16] und Tritiumgas 5-Formyluracil reduziert. PdO/BaSO_4 ist besonders zur Beschleunigung von Isotopenaustauschprozessen geeignet. Von uns wurde nämlich das Ziel verfolgt, neben der Reduktion noch zusätzlich einen Isotopenaustausch zu erzielen. Im Ergebnis dieser Experimente wurde festgestellt, daß der Katalysator das 5-Formyluracil nur zum 5-Hydroxymethyluracil quantitativ reduziert. Diese Umsetzung führte andererseits schon zu einer Doppelmarkierung, obwohl in dieser Stufe nur eine Einfachmarkierung zu erwarten wäre. Offenbar wird unter diesen Bedingungen zusätzlich das am Aldehyd befindliche Proton

^xDer Deuterierungsgrad wurde durch NMR-Spektrometrie bestimmt.

gegen Tritium ausgetauscht. Das so erhaltene tritiummarkierte 5-HMU wurde ohne einen Reinigungsschritt aufgearbeitet, um anschließend zum Thymin reduziert zu werden.

Die Reduktion von Hydroxymethylgruppen zu Methylgruppen erfolgt günstigerweise in einem sauren Medium. Um nun den Tritiumrücktausch aus dem markierten 5-HMU zu verhindern, benutzten wir absolut trockenes Dioxan als Reaktionsmedium und ließen die nötige Menge Säure im Reaktionskolben aus Palladiumchlorid entstehen. Als Katalysator diente uns Palladium-Mohr. Mit diesen Reaktionsbedingungen [18] wurde ein vollständiger Umsatz zu einem mehrfach markiertem Thymin mit einer spezifischen Aktivität von 2550 GBq/mmol erzielt. Dieses [methyl-³H] Thymin wurde nach einer üblichen enzymatischen Synthese [17] in [methyl-³H] Thymidin überführt. Nach der Reinigung betrug die spezifische Aktivität 2420 GBq/mmol. Das entspricht 2,35 Tritiumatome pro Molekül.

EXPERIMENTELLES

5-Formyluracil (6 mg = 42,9 μ mol) wird in 0,1 m Phosphatpuffer (0,7 ml, pH 7,0) mit PdO/BaSO₄ (100 mg) und 1200 GBq Tritiumgas bei 550 mm Quecksilbersäule 130 min gerührt. Danach wird das restliche Tritiumgas reabsorbiert. Der Katalysator wird abzentrifugiert, mit 2 ml H₂O gewaschen und die vereinigten Zentrifugate gefriergetrocknet. Das trockene Produkt wird mit Dioxan (4 ml) aufgenommen und der unlösliche Phosphatpuffer durch Zentrifugieren entfernt. Die klare Lösung wird gefriergetrocknet.

Der trockene Rückstand (tritiummarkiertes 5-Hydroxymethyluracil) wird mit absolut trockenem Dioxan (0,2 ml) aufgenommen, mit Pd-Mohr (3,5 mg) und PdCl₂ (2,0 mg) versetzt und mit 1100 GBq Tritiumgas bei 500 mm Quecksilbersäule 90 Minuten hydriert. Nach der Absorption des restlichen Tritiumgases am Uranspeicher wird dem Ansatz Dioxan (2 ml) zugefügt und der Katalysator durch Zentrifugieren abgetrennt. Das Zentrifugat wird gefriergetrocknet und der Rückstand mit Wasser (5 ml) aufgenommen und abermals gefriergetrocknet. Diese Prozedur wird noch einmal wiederholt, um das labil gebundene Tritium vollständig zu entfernen. Danach erhält man 3,1 mg (24,6 μ mol) [methyl-³H] Thymin mit einer spezifischen Aktivität von 2550

GBq/mmol und einer radiochemischen Reinheit von 86 %.

Ausbeute: 57,3 %.

Das [methyl-³H] Thymin (3,1 mg = 24,6 µmol) wird mit Hilfe des angegebenen enzymatischen Verfahrens und anschließender Reinigung [17] zu 3,5 mg (14,5 µmol) [methyl-³H] Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 2420 GBq/mmol umgesetzt. Die radiochemische Ausbeute beträgt 97 % und die chemische Ausbeute, bezogen auf das eingesetzte Thymin, 59 %.

Zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit benutzten wir Dünnschichtplatten UV-254 der Firma Sklarny Kavalier. Die Platten wurden in Chloroform/Methanol 85:15 entwickelt und am Scanner II der Firma Berthold/Friesecke ausgewertet. Der Gehalt der radioaktiven Verbindungen in Lösung wurde durch UV-Spektrometrie an dem Spektrometer DK 2 A der Firma Beckman bestimmt. Zur Aktivitätsmessung diente uns das Flüssigkeitszintillationsspektrometer LS-233 der Firma Beckman.

LITERATUR

- [1] Cleaver, J.E.
Thymidin Metabolism and Cell Kinetics 1967.
Amsterdam; North-Holland Publishing Co.
- [2] Verly, W.G. und Hunebelle, G.
Bull. Soc. chim. Belg. 66 (1957) 640
- [3] Taylor, J.H.; Woods, P.S. und Hughes, W.L.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 43 (1957) 122
- [4] Winand, M. und Gouverneur
Proceedings of the conference on Methods of
Preparing and Storing Marked Molecules (Brüssel,
13 - 16 Nov. 1963)
EUR 1625 , Euratom, May 1964
- [5] Shimoni, M. und Buchmann, O.
Israel Atomic Energy Commission, Beersheba,
Nuclear Research Center - Negev, NRCN - 434, May 1977
- [6] Pichat, L. et al.
Bull. Soc. chim France, 1973, 2719

- [7] Filip, J. und Vysata, F.
CSSR - Patent 133, 141 (Cl. C07d) 15. Juli 1969
CA 73 : 77276 j (1970)
- [8] Pleiß, U. und Römer, J.
DDR - Patent 200 021 (Cl. C07B/231 335 6)
9. März 1983
- [9] Pleiß, U.
Radiochem. Radioanal. Letters 51 (1982) 363
- [10] Pichat, L.
B.I.S.T. 1973, 178, 73
- [11] Viswanathan, K.V. et al.
Proceedings of the Chemistry Symposium, Vol. I,
Aligarh 1972, S. 85
- [12] Bärwolff, D. und Muravski, D.
DDR-Patent 128 847 (Cl. C07b)
14. Dezember 1977
- [13] Pleiß, U.
Jahresbericht 1978 Bereich Kernchemie
Zentralinstitut für Kernforschung Rossendorf
ZfK - 367, S. 92
- [14] Evans, E.A.
Tritium and its Compounds, 2 nd Edition,
Butterworths London 1974 S. 382
- [15] Mjasoedov, N.F. et al.
Akademie der Wissenschaften der UdSSR
Institut für Molekulargenetik Privatmitteilung
- [16] Kuhn, R. und Haas, H.J.
Angew. chem. 67 (1955) 785
- [17] Iwankowa, E.K. et al.
Radiochimia (USSR) 23 (1981) 296
- [18] Pleiß, U. und Römer, J.
DDR-Wirtschaftspatent angemeldet