

KFK-554

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

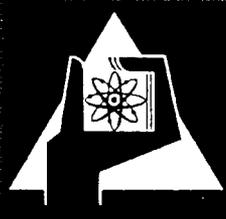
März 1967

KFK 554

Institut für Strahlenbiologie

Die Identifizierung freier Radikale in bestrahlten  
Einkristallen einiger Nukleinsäurekomponenten mittels  
Elektronenspin-Resonanz bei 8 mm Wellenlänge

H. Dertinger





Kernforschungszentrum Karlsruhe

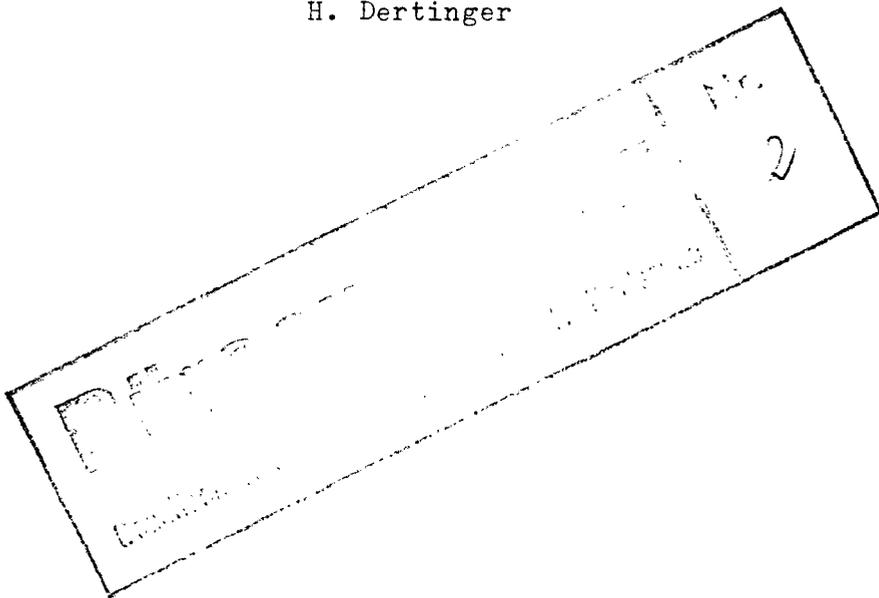
März 1967

KFK 554

Institut für Strahlenbiologie

Die Identifizierung freier Radikale in bestrahlten  
Einkristallen einiger Nukleinsäure-Komponenten  
mittels Elektronenspin-Resonanz  
bei 8 mm Wellenlänge

H. Dertinger



Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe



## Inhaltsverzeichnis

	Seite	
I.	Einführung; die Klassifizierung der ESR-Spektren bestrahlter Nukleinsäuren	1
II.	Theoretische Grundlagen der Elektronenspin-Resonanz bei kleiner Wellenlänge	3
1	Linienverschiebungen zweiter und höherer Ordnung	4
2	Verbotene Übergänge	6
3	Auflösung von ESR-Spektren mehrerer paramagnetischer Zentren	7
4	Empfindlichkeit und Mikrowellensättigung	8
III.	Die Auswertung von ESR-Einkristall-Spektren	9
1	Kopplungstensoren	9
2	Der g-Tensor	12
3	Die Bestimmung der Tensorelemente	13
4	Hauptachsentransformation	15
IV.	Das ESR-Spektrometer	16
1	Besonderheiten	16
2	Die Eichung des $Mn^{2+}$ -Referenzspektrums	18
V.	Die Kristallisation der Nukleinsäure-Komponenten	20
VI.	Ergebnisse und Diskussion	21
1	Thymidin	21
2	Dihydrothymin	23
3	Cytosin·H <sub>2</sub> O	28
3	4 Adenosin·HCl	31
	5 Desoxyadenosin·H <sub>2</sub> O	33
	6 Desoxyguanosin·HCl	34
	7 Das Triplett-Spektrum der Purin-Derivate	35
	8 Das ESR-Singulett der Purin-Derivate	39
VII.	Bedeutung für die Strahlenbiologie	41
VIII.	Zusammenfassung	44
IX.	Literaturverzeichnis	45
X.	Abbildungen	50

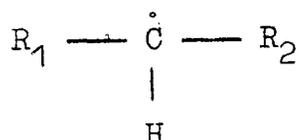
## I. Einführung; die Klassifizierung der ESR-Spektren bestrahlter Nukleinsäuren.

Unter den vielfältigen Reaktionen, die bei der Absorption ionisierender Strahlung in chemischen Verbindungen ablaufen und schließlich zu einem beobachtbaren Strahlenschaden (Effekt) führen, spielen die Vorgänge in der physiko-chemischen Phase (PLATZMAN 1958; HART und PLATZMAN 1961), innerhalb der die Trennung chemischer Bindungen und die Erzeugung freier Radikale erfolgen, eine bedeutende Rolle. Es läßt sich heute kaum daran zweifeln, daß die im späteren Stadium der Strahlenwirkung ablaufenden chemischen Reaktionen Folgeerscheinungen der Radikalerzeugung sind. Beobachtet man die Strahlenwirkung auf chemische Verbindungen im festen Zustand, so finden infolge der geringen Beweglichkeit der entstandenen Radikale weitere Reaktionen nur sehr langsam statt. Die stabilen Radikale können dann bequem mit Hilfe der Elektronenspin-Resonanz (ESR) nachgewiesen werden.

Die ESR-Methode wird etwa seit dem Jahre 1955 dazu benutzt, freie Radikale in bestrahlten biochemischen Verbindungen nachzuweisen mit dem Ziel, auch von dieser Seite her Beiträge zur Aufklärung des Mechanismus der biologischen Strahlenwirkung zu erbringen. Aus der großen Zahl der bis heute vorliegenden quantitativen und qualitativen ESR-Untersuchungen sind die an Nukleinsäuren, besonders an der Desoxyribonukleinsäure (DNS) sowie auch an deren Bestandteilen, den Nukleotiden, Nukleosiden, Basen und Zuckern durchgeführten Versuche von besonderem Interesse wegen der zentralen Bedeutung dieser Stoffe für die Vererbungsvorgänge wie auch für viele Reaktionsabläufe in somatischen Zellen. Um das Verständnis der folgenden Ausführungen zu erleichtern, sei in Abb. 1 in schematischer Darstellung ein Abschnitt des Riesenmoleküls der DNS wiedergegeben, die den prinzipiellen Aufbau (nicht jedoch die Größe von  $10^7$  Daltons) erkennen läßt.

Beim Studium der bisher veröffentlichten ESR-Spektren bestrahlter Nukleinsäuren ergibt sich ziemlich zwanglos eine Einteilung in 5 Komponenten, aus denen das ESR-Signal zusammengesetzt sein kann:

- 1) Eine mehr oder weniger breite Singulett-Linie, (vgl. VI. 8). Besonders die Purin-Basen zeigen dieses Signal, und zwar unabhängig von der Temperatur (KÖHNLEIN 1963, MÜLLER 1964)
- 2) Eine Dublett-Struktur von etwa 20 - 25 Oe Aufspaltung. Man beobachtet sie sowohl in der DNS des T2-Phagen, als auch in ganzen Phagen. Sie wird allgemein dem Radikaltyp



zugeordnet. Das Dublett tritt ferner in der  $\beta$ -2-Desoxy-D-Ribose nach Bestrahlung bei tiefen Temperaturen, sowie in Phagen-Protein in Erscheinung (MÜLLER 1964)

- 3) Ein 8-Linienspektrum mit ca. 20 Oe Linienabstand. Dieses Signal wurde von SALOVEY, SHULMAN und WALSH (1963) in bestrahlter Kalbsthymus-DNS beobachtet und von mehreren Autoren untersucht. Die Tatsache, daß es für Thymin-Verbindungen charakteristisch ist, und die Anwendung von Deutierungs-Techniken führten zur Entdeckung des 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikals, welches durch Wasserstoff-Anlagerung an die Position C<sub>(6)</sub> des Thymin-Ringes entsteht. (Näheres s. VI. 1)
- 4) Ein Triplet von 35 Oe Linienabstand. Dieses Spektrum, das durch Wechselwirkung des ungepaarten Spins mit 2 äquivalenten Protonen zustande kommt, fanden zuerst DORLET, VAN DE VORST und BERTINCHAMPS (1962) in bestrahlter DNS aus Forellenspermien. Es ist vergleichbar mit den ESR-Spektren bestrahlter Purin-Nukleoside und -Nukleotide (MÜLLER 1964). HERAK und GORDY (1965) erhielten ein ähnliches Spektrum, indem sie Purin-Basen einer Wasserstoff-Gasentladung aussetzten und schrieben es einem Wasserstoff-Anlagerungsradikal an C<sub>(8)</sub> des Purin-Ringes zu. (Näheres s. VI. 7). Auch bestrahlte D-Ribose zeigt bei tiefer Temperatur ein ähnliches Triplettspektrum (SINGH und CHARLESBY 1965).

5) Ein Dublett mit einer Aufspaltung  $< 20$  Oe. Obwohl diese Struktur im ESR-Signal der DNS noch nicht direkt nachgewiesen wurde, so ist doch wahrscheinlich, daß der breite Zentralteil der DNS-Spektren ein derartiges Signal enthält. Man erhält es bei der Bestrahlung von Thymidylsäure (ORMEROD 1965), Thymin und Desoxyuridin bei tiefer Temperatur, so wie in Cytosin und D-Ribose (MÜLLER 1964).

Die Identifizierung einiger Radikaltypen, insbesondere desjenigen, der dem zuletzt besprochenen ESR-Dublett zugrunde liegt, ist das Hauptziel dieser Arbeit. Zur Aufklärung der dem Dublett zugeordneten Radikalstruktur dienen hauptsächlich die Einkristall-Messungen am Cytosin-Monohydrat (VI. 3). Weitere Untersuchungen, besonders an bestrahlten Einkristallen von Adenosin-Hydrochlorid dienen der Klärung des Triplett-Spektrums der Purin-Nukleoside (VI. 4). Die Verwendung von Einkristallen ermöglicht dabei die Bestimmung der charakterisierenden Tensoren  $g$  (Landé-Tensor) und  $A$  (Kopplungstensor) und damit die Identifizierung der Radikale.

## II. Theoretische Grundlagen der Elektronenspin-Resonanz bei kleiner Wellenlänge

Während man bei den ESR-Untersuchungen üblicherweise die X-Band-Technik anwendet, d.h. mit Frequenzen von 9 GHz und einem Zeeman-Feld von 3,3 kOe arbeitet, besteht natürlich auch die Möglichkeit, höhere Frequenzen und Felder zu benutzen. In dieser Arbeit lag die Mikrowellenfrequenz im Q-Band, also bei 35 GHz, entsprechend einer Wellenlänge von etwa 8 mm und einem Magnetfeld von 12 kOe. Da Messungen unter diesen Bedingungen verhältnismäßig selten durchgeführt werden, erscheint es gerechtfertigt, an dieser Stelle auf die Besonderheiten der Elektronenspin-Resonanz bei höheren Frequenzen einzugehen. Dazu sind in diesem Abschnitt die theoretischen Grundlagen kurz zusammengefaßt.

Die in organischen Substanzen auftretenden strahleninduzierten Radikale enthalten im allgemeinen ein ungepaartes Elektron, dessen Spin mit einem oder mehreren Kernspins in Wechselwirkung steht und dadurch die Hyperfeinstruktur der ESR-Spektren verursacht. Die durch elektrostatische Kristallfelder (z.B. in Ionenkristallen) bedingte Feinstruktur fehlt jedoch im Falle der organischen Radikale. Vernachlässigt man auch noch den kleinen Beitrag des Kern-Zeeman-Effekts, so kann man den Spin-Hamilton-Operator für den Fall eines quasi-freien Elektrons in einem organischen Radikal in folgender Form schreiben:

$$H = \mu_B \vec{S} \cdot |g| \cdot \vec{H}_0 + \vec{S} \cdot |A| \cdot \vec{I} \quad (1)$$

Dabei sind  $\vec{S}$  und  $\vec{I}$  die Operatoren des Elektronen- bzw. Kernspins,  $\vec{H}_0$  das Zeeman-Feld und  $\mu_B = 0,92731 \cdot 10^{-20}$  erg/Oe das Bohr'sche Magneton. Der Landé-Faktor  $g$  hat hier allein wegen des Auftretens von Spin-Bahn-Kopplung Tensor-Charakter; jedoch weichen die Hauptwerte im allgemeinen wenig vom relativistisch korrigierten freien Spin-Wert 2,002292 ab. (Näheres s. III. 2). Die Tensor-Eigenschaft des Kopplungsfaktors  $A$  erklärt sich aus der Existenz der anisotropen Dipol-Wechselwirkung bei  $p_\pi$ -Radikalen (s. III. 1).

## II. 1 Linienverschiebungen zweiter und höherer Ordnung

Um einen Überblick zu gewinnen über die Verschiebungen höherer Ordnung in den ESR-Spektren oder, anders ausgedrückt, über die Feldabhängigkeit der Hyperfeinstruktur, genügt es zunächst,  $g$  und  $A$  als skalare Größen zu betrachten. Der Spin-Hamilton-Operator lautet dann, wenn  $H_0$  parallel zu  $S_z$ , der z-Komponente von  $S$  gelegt wird (HYDE, RANON und LANDGRAF 1965/66):

$$H = \mu_B g H_0 S_z + A(S_z I_z + S_x I_x + S_y I_y)$$

Mit  $S_z = M$ ,  $I_z = m$  und den Spin-Erhöungs- und Spin-Erniedrigungsoperatoren der Quantenmechanik  $S_{\pm} = S_x \pm iS_y$  bzw.  $I_{\pm} = I_x \pm iI_y$  kann  $H$  identisch umgeformt werden:

$$H = \mu_B g H_0 M + A \left[ Mm + \frac{1}{2} (S_+ I_- + S_- I_+) \right] \quad (2)$$

Die Operatoren  $S_{\pm}$  und  $I_{\pm}$  wirken folgendermaßen auf normierte Spin-Zustände, z.B.  $I_{\pm}$ :

$$I_{\pm} | m \rangle = [I(I+1) - m(m+1)]^{-1/2} | m \pm 1 \rangle \quad (3)$$

Die Matrixelemente lauten:

$$\begin{aligned} \langle m | I_{\pm} | m' \rangle &= [I(I+1) - m(m+1)]^{-1/2} \langle m | m' \pm 1 \rangle \\ &= [I(I+1) - m(m+1)]^{-1/2} \delta_{m, m' \pm 1} \end{aligned} \quad (4)$$

Analoges gilt für  $S_{\pm}$ . Berechnet man mit diesen Beziehungen die Matrixelemente von  $H$ , so bewirkt die  $\delta$ -Funktion von Gl. (4), daß als  $H$ -Matrix eine  $6 \times 6$ -Matrix angesetzt werden kann, die die Elemente für  $M = \pm 1/2$ ,  $m$  und  $m \pm 1$  ( $m = -I \dots +I$ ) enthält und im übrigen bis auf  $2 \times 2$ -Untermatrizen diagonal ist (Tab. 1). Durch Diagonalisierung der  $2 \times 2$ -Untermatrizen  $H^{(ik)}$  werden die Wechselwirkungsenergien  $E_{jj}$  berechnet. (Die Indizes  $i, j$  und  $k$  beziehen sich auf die Zeilen- und Spaltennumerierung der  $H$ -Matrix). Die Eigenwerte beispielsweise der Untermatrix  $H^{(23)}$  berechnen sich durch Lösen der charakteristischen Gleichung von  $H^{(23)}$  zu:

$$\begin{aligned} E_{22/33} &= \frac{1}{2} \text{Spur } H^{(23)} \pm \left[ \frac{1}{4} (\text{Spur } H^{(23)})^2 - \text{Det } H^{(23)} \right]^{1/2} \\ &= -\frac{A}{4} \pm \frac{1}{2} \left( \mu_B g H_0 + A m + \frac{A}{2} \right) \left[ 1 + A^2 \frac{[I(I+1) - m(m+1)]}{[\mu_B g H_0 + A(m + \frac{1}{2})]^2} \right]^{1/2} \end{aligned} \quad (5)$$

Da unter den genannten Bedingungen stets  $A \ll \mu_B g H_0$  ist, kann die Wurzel in Gl. (5) entwickelt werden und man erhält z.B. für  $E_{33}$ :

$$E_{33} = \frac{1}{2} (\mu_B g H_0 + Am) + \frac{A^2}{4} \frac{[I(I+1)-m(m+1)]}{\mu_B g H_0} - \dots \quad (6)$$

und analog aus  $H^{(45)}$ :

$$E_{44} = - \frac{1}{2} (\mu_B g H_0 + Am) - \frac{A^2}{4} \frac{[I(I+1)-m(m+1)]}{\mu_B g H_0} + \dots$$

Der Übergang  $E_{33} \rightarrow E_{44}$  ist nach den Auswahlregeln  $\Delta M = \pm 1$ ,  $\Delta M = 0$  der Elektronenspin-Resonanz erlaubt und erfolgt mit einer Frequenz  $\nu = \frac{E}{h}$ :

$$h\nu = \mu_B g H_0 + Am + \frac{A^2}{2 \mu_B g H_0} [I(I+1)-m^2] - \dots \quad (7)$$

Der 2. Term von Gl. (7) beschreibt die normale, feldunabhängige und äquidistante Hyperfeinstruktur, während der zu  $1/H_0$  proportionale 3. Term die Linien zu tieferem Feld verschiebt und wegen seiner Abhängigkeit von  $m^2$  eine Unsymmetrie in das ESR-Spektrum bringt. Ähnlich, nur zunehmend schwächer, wirken die nicht aufgeschriebenen höheren Glieder. Beim Übergang vom X-Band zum Q-Band betragen die Verschiebungen 2. Ordnung (proportional zu  $1/H_0$ ) nur noch  $1/4$  ihrer ursprünglichen Größe, die Verschiebungen 3. Ordnung nur noch  $1/64$  usf. Die Elektronenspin-Resonanz im Q-Band bietet also den Vorteil symmetrischer Spektren, was deren Interpretation erleichtern kann.

## II. 2 Verbotene Übergänge

Außer den Verschiebungen höherer Ordnung können im ESR-Spektrum noch die sog. verbotenen Übergänge, die den Auswahlregeln  $\Delta M = \pm 1$  und  $\Delta m = \pm 1$  gehorchen, auftreten. Man erhält sie rechnerisch erst, wenn man, mit der Hyperfeinstruktur-Wechselwirkung als Störung, die neuen Zustände  $\dagger$  ermittelt und damit die Übergangswahrscheinlichkeiten berechnet. An der Matrix des H-Operators (Tab. 1) erkennt man

Tabelle 1: Matrix des Spin-Hamilton-Operators

No.	$S_z$	$I_z$	1	2	3	4	5	6
			$+\frac{1}{2}$	$-\frac{1}{2}$	$+\frac{1}{2}$	$-\frac{1}{2}$	$+\frac{1}{2}$	$-\frac{1}{2}$
			m+1	m+1	m	m	m-1	m-1
1	$+\frac{1}{2}$	m+1	$\frac{1}{2} (\alpha+A)$					
2	$-\frac{1}{2}$	m+1		$-\frac{1}{2} (\alpha+A)$	$\frac{A}{2} (\beta-m)^{1/2}$			
3	$+\frac{1}{2}$	m		$\frac{A}{2} (\beta-m)^{1/2}$	$-\frac{\alpha}{2}$			
4	$-\frac{1}{2}$	m				$-\frac{\alpha}{2}$	$\frac{A}{2} (\beta+m)^{1/2}$	
5	$+\frac{1}{2}$	m-1				$\frac{A}{2} (\beta+m)^{1/2}$	$-\frac{1}{2} (\alpha-A)$	
6	$-\frac{1}{2}$	m-1						$\frac{1}{2} (\alpha-A)$

Abkürzungen:  $\alpha = u_B g H_0 + A m$  ;  $\beta = I (I+1) - m^2$  ;

sofort, daß z.B. der Übergang  $E_{33} \longrightarrow E_{44}$  erlaubt ist, während der Übergang  $E_{22} \longrightarrow E_{33}$  verboten ist. Die relative Intensität des verbotenen Übergangs errechnet sich durch eine Störungsrechnung in erster Näherung zu:

$$r = \frac{|\langle \uparrow_{22} | S | \uparrow_{33} \rangle|^2}{|\langle \uparrow_{33} | S | \uparrow_{44} \rangle|^2} = \frac{A^2 [I(I+1) - m(m+1)]}{2 (\mu_B g H_0)^2} \quad (8)$$

Ihre Resonanzbedingung erhält man, ähnlich wie im Falle der erlaubten Übergänge:

$$h\nu = \mu_B g H_0 + A \left( m \pm \frac{1}{2} \right) \pm \dots \quad (9)$$

Man sieht, daß die verbotenen Übergänge genau zwischen die erlaubten Hyperfeinstruktur-Linien fallen und ferner, daß ihre relativen Intensitäten von  $m$  abhängen und proportional zu  $1/H_0^2$  abnehmen. Man hat also beim Q-Band gegenüber dem X-Band eine Unterdrückung der verbotenen Übergänge um einen Faktor 16. Auch diese Tatsache kann zur Erleichterung der Interpretation von ESR-Spektren führen.

### II. 3 Auflösung von ESR-Spektren mehrerer paramagnetischer Zentren

In der höheren Auflösung der einzelnen Komponenten eines paramagnetischen Gemisches liegt ein großer Vorzug der ESR-Spektroskopie bei hohen Frequenzen. Zum Beweis dieser Tatsache wird für die verschiedenen Paramagnetica, deren Spektren nur Hyperfeinstruktur-Linien aufweisen dürfen, die Resonanzbedingung aufgeschrieben:

$$h\nu = \mu_B g_i H_i \quad (i = 1, 2 \dots \dots)$$

Hieraus folgt:

$$H_i - H_k = \Delta H_{ik} = \frac{h\nu}{\mu_B} \left( \frac{1}{\epsilon_i} - \frac{1}{\epsilon_k} \right)$$

Durch die Proportionalität des Abstandes  $\Delta H_{ik}$  der Mittelpunkte der Spektren i und k zur Frequenz, wird die Trennung (Auflösung) der ESR-Spektren bei einer Erhöhung der Frequenz begünstigt.

#### II. 4 Empfindlichkeit und Mikrowellensättigung

Der Hauptvorteil, der die Elektronenspin-Resonanz im Q-Band so außerordentlich bedeutungsvoll macht, ist der geringe Bedarf an Probesubstanz. Um einen Überblick zu gewinnen über die bei hohen Frequenzen zu erwartende Steigerung der Volumempfindlichkeit, wird der Fall betrachtet, daß Paramagnetica mit begrenztem, d.h. nicht den ganzen Meßhohlraum erfüllendem Volumen vorliegen. Sie können ferner noch mit dielektrischen Verlusten behaftet sein und einen relaxationsbedingten Mikrowellen-Sättigungseffekt zeigen. In diese Kategorie fallen praktisch alle biologisch wichtigen Substanzen. Unter Berücksichtigung der Frequenzabhängigkeit des Imaginärteiles der magnetischen Suszeptibilität, des Füllfaktors und der Resonatorgüte ergibt sich für die Signalamplitude (HYDE 1965):

$$\text{Signal} \sim \begin{cases} \nu^{11/4} [T_1(\nu) T_2(\nu)]^{-1/2} & \text{Mikrowellen-Sättigung} \\ \nu^{7/2} [P_0(\nu)]^{1/2} & \text{keine Mikrowellen-Sättigung} \end{cases}$$

Dabei ist  $P_0$  die Mikrowellenleistung an der Probe,  $T_1$  die Spin-Gitter-Relaxationszeit;  $T_2$  entspricht etwa der Spin-Spin-Relaxationszeit.

Bei dieser Berechnung geht die exponentielle Energieabhängigkeit der Boltzmann-Verteilung in das Frequenzverhalten des Imaginärteiles der magnetischen Suszeptibilität ( $\sim \nu$ ) ein. Aus dieser Betrachtung folgt, daß bei konstantem Probenvolumen beim Übergang vom X-Band zum Q-Band mit einem maximal 100-fach stärkeren ESR-Signal gerechnet werden kann, so daß sich also die Elektronenspin-Resonanz im Q-Band immer dann empfiehlt,

wenn nur geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen.

Diesen vielfältigen Vorteilen steht eine praktische Schwierigkeit gegenüber, die darin besteht, daß das Absorptionssignal bei hohen Frequenzen eine stärkere Mikrowellen-Sättigung zeigt, als das Dispersionssignal, welches sich als reaktive Komponente in einer Verstimmung des Meßhohlraumes an der Resonanzstelle des ESR-Übergangs bemerkbar macht. Je nach Art der organischen Probe ist es entweder überhaupt unmöglich, mit einem konventionellen Q-Band-Spektrometer ein Absorptionssignal zu erhalten, oder aber die Abstimmung der Mikrowellenbrücke ist so kritisch, daß geringste unkontrollierbare Veränderungen im Stabilisierungs- und Abstimmsystem zum Verschwinden des Absorptionssignales führen können. Auf welche Weise diese unangenehme Schwierigkeit behoben werden kann, ist in Abschnitt IV. 1 behandelt.

### III. Die Auswertung von ESR-Einkristall-Spektren

#### III. 1 Kopplungstensoren

Organische Radikale sind dadurch gekennzeichnet, daß im allgemeinen das ungepaarte Elektron ein  $2p$ -Orbital (z.B.  $2p_z$ ) eines Zentralatoms, meistens Kohlenstoff oder Stickstoff, einnimmt. Durch Beimischung angeregter kugelsymmetrischer Zustände hat dieses Elektron zusätzlich geringen  $s$ -Charakter (eine geschlossene Darstellung findet sich z.B. in dem Buch von INGRAM 1958). Berücksichtigt man die verschiedenen Möglichkeiten der Stellung des wechselwirkenden Nuklids zur Radikalstelle und die verschiedenen Wechselwirkungs-Mechanismen, so resultiert für derartige lokalisierte Radikale eine Einteilung in folgende 3 Fälle:

1) Es besteht Wechselwirkung mit dem Kernspin des Zentralatoms (z.B. mit dem  $N^{14}$ -Kern).

In diesem Fall beobachtet man sowohl die anisotrope Dipol-Wechselwirkung zwischen den Spinmomenten als auch, hervorgerufen durch eine geringe  $s$ -Dichte am

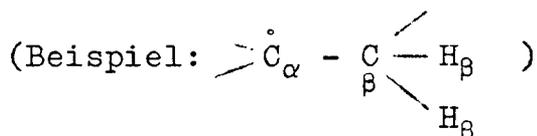


$A_1$	]	parallel zur $H_\alpha$ -Bindung	Radikalebene
$-A_1$	]	senkrecht " " "	
0	]	parallel zur 2p-Orbitalachse	

Auch dieser Befund wird durch zahlreiche ESR-Experimente an Einkristallen bestätigt. Typische Werte für  $\alpha$ -Protonen sind:

$$A_0 = -21 \text{ Oe}; \quad A_1 = 12 \text{ Oe}.$$

3) Die Wechselwirkung erstreckt sich auf  $\beta$ -Protonen.



Die hier beobachtete Kopplung ist überwiegend isotrop und wird in guter Näherung durch eine Beziehung folgender Art beschrieben:

$$A = (B_0 + B_1 \cos^2 \theta) \rho; \quad (10)$$

Dabei ist  $\rho$  die Spindichte an  $C_\alpha$  und  $\theta$  der Winkel zwischen der  $C_\beta - H_\beta$ -Richtung und der 2p-Orbitalachse, projiziert in eine Ebene senkrecht zur  $C_\alpha - C_\beta$ -Bindung. Die Konstanten  $B_0$  und  $B_1$  lauten für verschiedene Fragmente (WHIFFEN 1966):

Fragment	$B_0$ (Oe)	$B_1$ (Oe)
$\text{>}\overset{\cdot}{\text{C}} - \underset{\beta}{\text{C}} \begin{array}{l} \diagup \\ \text{H} \\ \diagdown \end{array}$	3,6	50
$\text{>}\overset{\cdot}{\text{C}} - \text{N} \begin{array}{l} \diagup \\ \text{H} \\ \diagdown \end{array}$	0,7	38
$\text{>}\overset{\cdot}{\text{C}} - \text{O} - \text{H}$	-3,2	30,5

Diese Art der Kopplung kann man durch Beimischung eines angeregten Radikalzustandes



zum Grundzustand



erklären, wofür man den Begriff "Hyperkonjugation" benützt, oder einfach durch Überlappung der Elektronenwolken von  $H_\beta$  und dem 2p-Orbital, woraus die Abhängigkeit von  $\cos^2 \theta$  besonders klar wird. Ihrem Vorzeichen nach ist diese Kopplung der isotropen  $H_\alpha$ -Kopplung entgegengesetzt und zwar positiv zu rechnen.

### III. 2 Der g-Tensor

Der Tensor-Charakter des g-Faktors bei freien organischen Radikalen ist eine Folge der Spin-Bahn-Kopplung, die dem Radikal-Grundzustand angeregte Zustände beimischt, so daß bereits in erster störungstheoretischer Näherung die Wellenfunktion des Grundzustandes verändert wird. Das führt zu einer anisotropen Änderung der Zeeman-Aufspaltung und damit zu einer Abweichung des g-Faktors vom freien Spin-Wert (BLUMENFELD, WOJEWODSKI und SEMJONOW 1966). Der g-Tensor nimmt im allgemeinen den kleinsten Hauptwert längs der 2p-Orbitalachse an, während in der Radikalebene 2 Maximalwerte liegen. Da die Spin-Bahn-Kopplungskonstante als charakteristischer Atom-Parameter in diese Verschiebung eingeht, gibt der g-Tensor über die Art des Zentralatoms Auskunft, was für die Identifizierung der Radikale von großer Bedeutung ist. Tab. 2, in der eine Anzahl bisher veröffentlichter g-Tensoren für verschiedene strahlenerzeugte Fragmente zusammengestellt sind, bestätigt diesen Tatbestand sehr gut.

Tabelle 2: Charakteristische g-Tensoren

Ausgangssubstanz/ Radikal	Hauptwerte des g-Tensors	Autoren
1) <u>COH-Radikale</u> $\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\overset{\cdot}{\text{C}}-\text{COOH} / \\   \\ \text{OH} \\ \text{H}-\overset{\cdot}{\text{C}}-\text{COOH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	2,0053 2,0038 2,0017	ATHERTON und WHIFFEN (1960, I)
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\overset{\cdot}{\text{C}}-\text{COOK} / \\   \\ \text{OH} \\ \text{H}-\overset{\cdot}{\text{C}}-\text{COOK} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	2,0054 2,0039 2,0021	ATHERTON und WHIFFEN (1960, II)
2) <u>Stickstoff-Radikale</u> $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4 /$ $\begin{array}{c} \cdot \\   \\ -\overset{+}{\text{N}}- \\   \\ \text{H} \end{array}$	2,0026 2,0089 2,0048	MORTON (1963)
$\begin{array}{c} \text{NH}(\text{SO}_3\text{K})_2 / \\ \cdot \\ \text{N}(\text{SO}_3^-)_2 \end{array}$	2,0025 2,0082 2,0042	HORSFIELD, MORTON, ROWLANDS und WHIFFEN (1962)
$\begin{array}{c} \text{NH}_2(\text{SO}_3\text{K}) / \\ \cdot \\ \text{NH}(\text{SO}_3^-) \end{array}$	2,0037 2,0078 2,0038	ROWLANDS (1962)
$\begin{array}{c} \text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Cl} / \\ (\text{CH}_3)_3\overset{\cdot}{\text{N}}^+ \end{array}$	2,0042 2,0048 2,0042	TENCH (1963)

Tabelle 2: Charakteristische g-Tensoren (Fortsetzung)

Ausgangssubstanz/ Radikal	Hauptwerte des g-Tensors	Autoren
3) <u>Kohlenstoff-Radikal</u>		
$\text{H}_2\dot{\text{C}}(\text{COOH})_2 /$ $\text{H}\dot{\text{C}}(\text{COOH})_2$	2,0026 2,0035 2,0033	McCONNELL, HELLER COLE und FESSENDEN (1960)
$\text{H}_2\dot{\text{C}}(\text{COOH})_2 /$ $\text{H}_2\dot{\text{C}}(\text{COOH})$	2,0020 2,0042 2,0034	HORSFIELD, MORTON und WHIFFEN (1961)
$\text{CH}_3\dot{\text{C}}\text{H}(\text{COOH})_2 /$ $\text{CH}_3\dot{\text{C}}(\text{COOH})_2$	2,0026 2,0044 2,0034	HELLER (1962)
$\text{CH}_2(\text{SO}_3\text{K})_2 /$ $\dot{\text{C}}\text{H}(\text{SO}_3^-)_2$	2,0019 2,0025 2,0033	HORSFIELD, MORTON ROWLANDS und WHIFFEN (1962)
Thymidin / 5,6-Dihydro-Thymyl- (5)-Radikal	2,0026 2,0026 2,0042	PRUDEN, SNIPES und GORDY (1965)

### III. 3 Die Bestimmung der Tensorelemente

Während die anisotrope Kopplung in paramagnetischen Flüssigkeiten infolge schneller statistischer Bewegung verschwindet ( $1 - 3 \cos^2 \phi = 0$ ) und in polykristallinen Proben zusammen mit dem g-Tensor eine Linienverbreiterung und Asymmetrie der ESR-Spektren bewirkt, ist man bei Einkristallen in der Lage, die Elemente des g- und Kopplungstensors vollständig zu bestimmen. Die Kenntnis dieser Elemente kann die Identifizierung des Radikals wesentlich erleichtern.

Die Elemente des g-Tensors werden gewöhnlich nach einem Verfahren gewonnen, welches von GEUSIC und BROWN (1958) theoretisch begründet wurde. Die beiden Autoren zeigten für freie Radikale, daß die Resonanzbedingung für einen Zeeman-Übergang, falls der g-Tensor nicht diagonal ist, folgendermaßen lautet:

$$\left(\frac{h\nu}{\mu_B}\right)^2 = \sum_{j,k=1}^3 (g^2)_{jk} H_j H_k, \text{ mit:}$$

$$(g^2)_{jk} = \sum_{i=1}^3 g_{ij} g_{ik}$$

Die Größen  $(g^2)_{jk}$  werden nun bestimmt, in dem man den paramagnetischen Einkristall nacheinander um drei kartesische Achsen 1, 2 und 3 dreht und dabei die Winkelabhängigkeit des g-Faktor-Quadrates  $g_e^2$  registriert. Für die Drehung um die Achse 1 ist dann offenbar:

$$H_1 = 0; H_2 = H_0 \cos \varphi_1; H_3 = H_0 \sin \varphi_1; (\varphi_1 = \text{Drehwinkel})$$

Hieraus folgt:

$$\begin{aligned} \left(\frac{h\nu}{\mu_B H_0}\right)^2 = g_e^2(\varphi_1) &= (g^2)_{22} \cos^2 \varphi_1 + (g^2)_{33} \sin^2 \varphi_1 + \\ &2(g^2)_{23} \sin \varphi_1 \cos \varphi_1 \end{aligned}$$

Oder auch:

$$g_e^2(\varphi_1) = \frac{1}{2} [(g^2)_{22} + (g^2)_{33}] + A_1 \sin(2\varphi_1 + \alpha_1),$$

mit:

$$A_1 = \left[ \frac{1}{4} [(g^2)_{22} - (g^2)_{33}]^2 + (g^2)_{23}^2 \right]^{1/2}$$

Amplitude der sinusförmigen Variation von  $g_e^2$

und:

$$\operatorname{tg} \alpha_1 = \frac{(g^2)_{22} - (g^2)_{33}}{2 (g^2)_{23}}$$

Hieraus folgt weiter:

$$g_e^2(0) = g_e^2(\pi) = (g^2)_{22}; \text{ und } g_e^2(\pi/2) = (g^2)_{33} \quad (11)$$

$(g^2)_{23}$  bestimmt sich aus  $A_1$  zu:

$$(g^2)_{23} = (g^2)_{32} = \left[ A_1^2 - \frac{1}{4} [(g^2)_{22} - (g^2)_{33}]^2 \right]^{1/2} \quad (12)$$

Durch zyklische Vertauschung der Indizes erhält man die analogen Ergebnisse für die Drehung um die beiden anderen Achsen. Evident ist der Tensor diagonal, wenn die Extremwerte von  $g_e^2(\varphi)$  längs der Achsen angenommen werden. Die eigentlichen  $g$ -Tensor-Hauptwerte sind die positiven Quadratwurzeln aus den Elementen des so erhaltenen und gegebenenfalls noch diagonalisierten Tensors (s. III. 4). Ähnliche Überlegungen lassen sich für den Kopplungstensor  $|A|$  anstellen.

Die Bestimmung der Tensorelemente besteht also darin, in dem Einkristall ein geeignetes kartesisches Koordinatensystem festzulegen, ihn nacheinander um diese Achsen zu drehen und dabei die Winkelvariation des Quadrates des  $g$ - bzw. des Kopplungsfaktors zu registrieren. Ist der erhaltene Tensor nicht diagonal, so muß anschließend eine Hauptachsentransformation ausgeführt werden.

### III. 4 Hauptachsentransformation

Die mathematische Ausführung einer allgemeinen Hauptachsentransformation ist mit erheblichem Rechenaufwand verbunden und wird daher zumeist einer Rechenmaschine überlassen. Für den folgenden speziellen Fall, der beim Cytosin-Radikal (VI. 3) eintritt, kann man jedoch die erforderliche Transformation explizite angeben. Die Formeln, die unter anderem auch den Drehwinkel liefern, seien daher im Hinblick auf die spätere Verwendung mitgeteilt.

Der nicht diagonale  $g$ -Tensor, nach dem in Abschnitt II. 3 Gesagten, der "quadratische"  $g$ -Tensor habe die Gestalt:

$$|G| = \begin{vmatrix} G_{11} & G_{12} & 0 \\ G_{12} & G_{22} & 0 \\ 0 & 0 & G_{33} \end{vmatrix} \quad (13)$$

Er soll durch eine orthogonale Transformation  $|T|$  in eine Diagonalmatrix  $|\tilde{G}|$  überführt werden, wobei gilt:

$$|\tilde{G}| = |T| |G| |T|^{-1} = |T| |G| |T|^{\text{transp.}}$$

Dies wird, wie leicht einzusehen ist, durch eine Drehung um einen bestimmten Winkel  $\delta$  um die Achse 3 bewirkt.

Es wird daher:

$$|T| = \begin{vmatrix} \cos \delta & -\sin \delta & 0 \\ \sin \delta & \cos \delta & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{vmatrix} \quad (14)$$

Damit  $|\tilde{G}|$  eine Diagonalmatrix wird, ist notwendig und hinreichend, daß:

$$\text{tg } 2\delta = \frac{2 G_{12}}{G_{22} - G_{11}} \quad (15)$$

Es folgt dann für  $|\tilde{G}|$ :

$$|\tilde{G}| = \begin{vmatrix} G_1 & & \\ & G_2 & \\ & & G_3 \end{vmatrix}$$

mit:

$$G_1 = G_{22} - (G_{22} - G_{11})\cos^2\delta - \frac{G_{12}^2}{\left[\frac{(G_{22} - G_{11})^2}{2} + G_{12}^2\right]^{1/2}} \quad (16)$$

$$G_2 = G_{22} - (G_{22} - G_{11})\sin^2\delta - \frac{G_{12}^2}{\left[\frac{(G_{22} - G_{11})^2}{2} + G_{12}^2\right]^{1/2}}$$

$$G_3 = G_{33}$$

Schließlich wird:

$$|g| = \begin{vmatrix} + G_1^{1/2} & & \\ & + G_2^{1/2} & \\ & & + G_3^{1/2} \end{vmatrix} \quad (17)$$

Mit diesem mathematischen Rüstzeug können die ESR-Einkristall-Spektren in den Abschnitten VI ausgewertet werden.

#### IV. Das ESR-Spektrometer

##### IV. 1 Besonderheiten

Alle Messungen wurden mit einem konventionellen Q-Band-Spektrometer ("Microspin", von Hilger u. Watts) durchgeführt. Das Gerät arbeitet mit 100 KHz Magnetfeld-Modulation und phasenempfindlichem Detektorsystem, wodurch die 1. Ableitung des ESR-Signals aufgezeichnet wird. Die Stabilisierung der Mikrowellenfrequenz erfolgt nach dem Pound-System. Da ein nach diesem Prinzip arbeitendes Spektrometer im Buch

von INGRAM (1958) beschrieben ist, braucht hier nicht näher darauf eingegangen zu werden.

Die Drehbarkeit des Magneten vereinfachte die Registrierung der Einkristall-Spektren, weil sich die stets problematische Drehvorrichtung für den Kristall erübrigte, der damit starr in den Resonator einjustiert werden konnte. Erst nach zahlreichen Änderungen in fast allen elektronischen Untereinheiten erreichte das Gerät die hohe Empfindlichkeit und Stabilität, die eine einwandfreie Untersuchung der sehr kleinen Einkristalle ermöglichte. Abgesehen von diesen Änderungen vorwiegend betriebstechnischer Natur, waren im wesentlichen 2 Modifizierungen erforderlich, die unmittelbar die Spektroskopie von Einkristallen betrafen:

- 1) Die Konstruktion eines zylindrischen  $H_{011}$ -Meßresonators ohne eingearbeitete Modulationsspulen

Sie erfolgte im Prinzip in Anlehnung an den Hilger u. Watts-Resonator, wobei jedoch der eigentliche Zylinder aus einer mechanisch gut zu bearbeitenden keramischen Masse vulkanischen Ursprungs gefertigt<sup>+</sup>) und anschließend durch Bedampfen im Hochvakuum innen mit einem Goldbelag versehen wurde. Diese Konstruktion gewährleistete bei guter Leitfähigkeit und mechanischer Stabilität die Durchlässigkeit für das von außen ausgelegte 100 KHz-Modulationsfeld. Der Resonator wurde sodann durch Fehl-anpassung gedämpft, was dadurch erreicht wurde, daß der Durchmesser des Koppelloches zum Rechteck-Hohlleiter knapp über dem kritischen Maß für den Schwingungseinsatz gewählt wurde. Im Gegensatz zu den üblichen Q-Band-Resonatoren erlaubte der auf diese Weise breitbandig gemachte Resonator die Aufzeichnung des reinen Absorptionssignales auch bei den stark sättigenden organischen Proben, so daß damit die in Abschnitt III. 4 aufgezeigte Schwierigkeit behoben war. Durch 2 axiale Bohrungen im Boden und im Deckel des Resonators konnten die Proben

---

<sup>+</sup>) Lava Grade "A", Minnesota Mining and Manufacturing Company.

in das magnetische Mikrowellenfeld eingeführt werden. Die Kristalle wurden unter der Lupe in passend hergestellte Quarzröhrchen einjustiert und durch Teflon-Stücke in ihrer Position fixiert. An den Röhrchen war jeweils ein Zeiger angebracht, der die Orientierung bestimmter Kristallrichtungen zum Magnetfeld zu ermitteln gestattete. Als Referenzspektrum dienten die 6 Linien einer  $Mn^{2+}$ -Probe, die durch die zweite Resonator-Bohrung eingebracht werden konnte und stets mitregistriert wurde. Die Eichung dieses Spektrums wird im Abschnitt IV. 2 beschrieben.

## 2) Die Modifizierung der 100 KHz-Feldmodulation

Da das Modulationsfeld stets parallel zum Zeeman-Feld verlaufen muß, wurden die beiden Modulationsspulen in Helmholtz-Anordnung auf die Magnetpolschuhe montiert. Ein für diesen Zweck gebauter 100 KHz-Schmalband-Verstärker, der für Ausgangsleistungen bis 100 Watt ausgelegt war, diente zur Speisung der Spulen und erzeugte einen maximalen Feldhub von etwa 10 Oe am Ort der Probe.

## IV. 2 Die Eichung des $Mn^{2+}$ -Referenzspektrums

Zur Bestimmung des g-Faktors und des Linienabstandes des  $Mn^{2+}$ -Spektrums diente eine Protonenresonanz-Meßeinrichtung der AEG bestehend aus Meßsonde, Detektor, Regelspannungserzeuger zur Nachführung der Protonenfrequenz und Eichmarkengeber, sowie das Quarz-Normal XUA (0-30 MHz) von Rhode u. Schwarz. Geeicht wurde gegen den g-Faktor des polykristallinen Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH):

$$g_D = 2,00366 \pm 0,00004$$

Die Eichmarken für den Linienabstand wurden durch Vergleich der mit dem Magnetfeld-Sweep geführten Protonenresonanz-Frequenz mit Oberschwingungen einer Festfrequenz erhalten. Aus der Resonanzbedingung für den Elektronenspin errechnet

man sich leicht die folgende Beziehung:

$$g_{\text{Mn}^{2+}} \approx g_D^{-2} \cdot \frac{H_{\text{Mn}^{2+}} - H_D}{H_D} \quad (18)$$

$H_D$  ist dabei die Resonanzfeldstärke des DPPH-Signals. Sie bestimmt sich aus der zugehörigen Protonenfrequenz  $\bar{\nu}_D$  nach der Formel:

$$H_D(\text{Oe}) = 0,2348741 \cdot \bar{\nu}_D (\text{MHz})$$

$\bar{\nu}_D$  wurde mit Hilfe des Quarz-Normales bestimmt, wobei dessen Ausgang wegen  $\bar{\nu}_D > 30$  MHz, durch eine Diode verzerrt werden mußte. Die Messung von  $\bar{\nu}_D$  bei der benutzten Mikrowellenfrequenz ergab:

$$\bar{\nu}_D = 51,0193 \pm 0,0001 \text{ MHz}$$

Hieraus folgt:

$$H_D = 11,983 \pm 0,0002 \text{ kOe}$$

Aus dem Eichmarkenabstand ergab sich:

$$H_{\text{Mn}^{2+}} - H_D = 13 \text{ Oe}$$

wobei  $H_{\text{Mn}^{2+}}$  der Mittelpunkt der Verbindung der Linien 2 und 5 des  $\text{Mn}^{2+}$ -Spektrums ist. Damit erhält man nach Gl. (18):

$$g_{\text{Mn}^{2+}} = 2,0015 \pm 0,0001$$

Schließlich betragen die Linienabstände (in Oe):

Linie Nr.	1	2	3	4	5	6	
		65		66		68	
				69,5		71,5	
							→ $H_0$

$$g = 2,0015$$

Den unbekanntem g-Faktor berechnet man nun aus dem in Oe gemessenen Abstand  $\Delta H$  der Mittelpunkte des Probenspektrums

und der Linien 2 und 5 des  $Mn^{2+}$ -Spektrums unter Benutzung von Gl. (18):

$$g \approx g_{Mn^{2+}} + 2 \cdot \frac{\Delta H}{H_{Mn^{2+}}} \approx 2,0015 + \frac{\Delta H}{6} \cdot 10^{-3} \text{ Oe}^{-1} \quad (19)$$

#### V. Die Kristallisation der Nukleinsäure-Komponenten

Die Zucht von Einkristallen brauchbarer Größe bereitete zunächst einige Schwierigkeiten. Für die einzelnen Substanzen mußten geeignete Lösungsmittel und Kristallisationsmethoden erprobt werden. Wasser, leicht flüchtige Verbindungen, wie verdünnter Ammoniak, Äthanol und Isopropanol und ferner verdünnte Salzsäure dienten als Lösungsmittel. Als bewährte Kristallisationsmethoden standen das Verdunsten des Lösungsmittels bei Zimmertemperatur und die langsame Abkühlung einer gesättigten Lösung mit anschließender Kristallisation bei extrem konstanter Temperatur zur Auswahl. Die Anforderungen an die Konstanz der Kristallisationstemperatur waren zum Teil so hoch, daß erst brauchbare Einkristalle von Adenosin · HCl und Desoxyguanosin · HCl erhalten wurden, nachdem ein Transistor-beheiztes und -gesteuertes Temperaturbad gebaut war. In Tab. 3 sind diejenigen Kombinationen von Lösungsmittel und Kristallisationsmethode zusammengestellt, die die besten Einkristalle ergaben. Es wurden außerdem noch Einkristalle von Desoxycytidin · HCl, Thymin · H<sub>2</sub>O und Adenin · HCl gezüchtet, deren ESR-Spektren jedoch entweder zu kompliziert waren, um bis jetzt eindeutig geklärt zu werden (Desoxycytidin · HCl), oder aber zu schwach waren, um in allen Orientierungen verfolgt zu werden. (Thymin · H<sub>2</sub>O und Adenin · HCl). Diese Verbindungen sind deshalb nicht in Tab. 3 aufgeführt. Die Kristallisationstemperatur bei der Abkühlungsmethode lag zwischen 30 und 40 °C. Von den erhaltenen Kristallen wurden unter dem Mikroskop die am besten ausgebildeten Exemplare ausgesucht, die sich dann auch bei der röntgenografischen Untersuchung als Einkristalle erwiesen (SCHNEIDER 1966). Diese Kristalle wurden anschließend bei Zimmertemperatur und Luftzutritt mit Co-γ-Strahlung

Tabelle 3: Einkristalle verschiedener Nukleinsäure-Komponenten

Substanz	Lösungsmittel	Kristallisations- methode	Kristallform / Abmessungen (mm)
Thymidin	Äthanol	Verdunstung	Prismen / 5 x 2 x 1
Dihydrothymidin	Isopropanol	Abkühlung von 60° auf 30° (ca. 1°/h)	Plättchen / 4 x 1,5 x 0,3
Cytosin	Wasser	Verdunstung	Plättchen / 4 x 2 x 0,4
Adenosin	verd. Salzsäure	Abkühlung	Prismen / 4 x 1,5 x 1
Desoxyadenosin	Wasser	Abkühlung	Plättchen / 5 x 3 x 0,4
Desoxyguanosin	verd. Salzsäure	Abkühlung	Prismen / 4 x 0,5 x 0,5

(Gammacell 220 der Atomic Energy of Canada Ltd.) mit Dosen bis zu  $10^7$  rad bestrahlt. Die vorher farblosen Kristalle zeigten danach charakteristische Verfärbungen. Durch Behandlung aller in Tab. 3 aufgeführten Verbindungen mit 99,7 %igem  $D_2O$  wurden N-H- und O-H-Wasserstoffe durch Deuterium ersetzt und die so deuterierten Substanzen ebenfalls bestrahlt.

## VI. Ergebnisse und Diskussion

Die ESR-Spektren der bestrahlten Kristalle wurden stets zusammen mit dem  $Mn^{2+}$ -Referenzspektrum in Intervallen von  $15^\circ$  registriert. Die Festlegung der Kartesischen Drehachsen (im folgenden als x, y und z bezeichnet) erfolgte in enger Anlehnung an charakteristische Kanten und Flächen der Kristalle. Selbst bei den kleinsten Exemplaren lag dadurch die Justiergenauigkeit noch innerhalb der Grenzen  $\pm 10^\circ$ . Die besten Ergebnisse lieferten die Einkristalle von Dihydrothymidin, Cytosin $\cdot H_2O$  und Adenosin $\cdot HCl$ , die deshalb in den entsprechenden Abschnitten ausführlich behandelt werden. Die Resultate von Desoxyadenosin $\cdot H_2O$  und Desoxyguanosin $\cdot HCl$ , die nur der weiteren Bestätigung der Befunde beim Adenosin dienen, sind daher mehr oder weniger kurz abgehandelt. An großen und gut ausgebildeten Einkristallen von Thymidin, deren ESR-Spektroskopie bereits Thema einer Dissertation war (PRUDEN 1965), wurde die Methode erprobt. Die wichtigsten Ergebnisse, die gut mit denjenigen von Pruden übereinstimmen, sind im folgenden Abschnitt kurz zusammengefaßt.

### VI. 1 Thymidin

(Strukturformel s. Abb. 2)

In Gegenwart von Wasserstoff-Radikalen bildet sich in bestrahlten Thymin-Verbindungen vorwiegend das schon im Abschnitt I erwähnte 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikal, welches ein charakteristisches 8-Linienspektrum liefert und durch Wasserstoff-Anlagerung an die Position  $C_{(6)}$  des Thymins ent-

steht. Abb. 4 zeigt dieses ESR-Spektrum bei einem Einkristall von Thymidin, wobei das Magnetfeld  $H_0$  der  $b'$ -Achse (PRUDEN 1965) parallel ist. In anderen Orientierungen werden schlechter aufgelöste Spektren erhalten, was durch die Existenz mehrerer magnetisch unterscheidbarer Positionen erklärt werden kann, deren Spektren sich überlagern. Bei der hier vorliegenden orthorhombischen Symmetrie sind maximal 4 derartige Positionen möglich, herrührend von den 4 Molekülen der Elementarzelle.

Die beobachtete Aufspaltung ist isotrop und muß daher auf  $\beta$ -Protonen zurückgeführt werden. Normiert man die Linienamplituden der äußersten Linien in Abb. 4 auf 1, so gehorchen die Linien ziemlich genau dem Amplitudenverhältnis 1:3:5:7:7:5:3:1. Die Summe der normierten Amplituden beträgt

$$32 = 2^5$$

Daraus resultiert eine Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit 5 Protonen. Das obige Amplitudenverhältnis ergibt sich nur, wenn von den 5 Protonen je 2 und 3 äquivalent sind, wobei die Kopplung zu je 2 doppelt so groß ist, wie die Kopplung zu den restlichen. Hieraus schließt man eindeutig auf das 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikal (Abb. 3), wobei die Methylgruppe 3 äquivalente und die Position  $C_{(6)}$  2 äquivalente Protonen beisteuert.

Dieses Radikal weist jedoch eine strukturelle Besonderheit auf. Um dies einzusehen, wird zunächst aus der Kopplung der Methylprotonen

$$A_{CH_3} = 20,3 \text{ Oe}$$

die Spindichte an  $C_{(5)}$  berechnet. Da die Methylgruppe bei Zimmertemperatur rotiert, muß in Gl. (10) über  $\cos^2\theta$  gemittelt werden. Es ist also  $\cos^2\theta = 1/2$ , woraus sich unter Benutzung der Werte  $B_0 = 3,6 \text{ Oe}$  und  $B_1 = 50 \text{ Oe}$  von S. 11 ergibt:

$$p_{C_{(5)}} = 0,71$$

Dieser Wert stimmt mit dem von MANTIONE und PULLMAN (1964) berechneten Wert von 0,72 gut überein. Errechnet man daraus und aus der Kopplung der Methylenprotonen an  $C_{(6)}$  von

$$A_{CH_2} = 40,6 \text{ Oe}$$

die Winkel  $\theta$  für diese Protonen, so ergibt sich:

$$\theta_1 \approx 49^\circ \text{ und } \theta_2 = 180^\circ - \theta_1 = 131^\circ$$

während man für den Fall reiner Tetraederbindung an  $C_{(6)}$  Werte von  $30^\circ$  bzw.  $150^\circ$  erwarten würde. Man schließt daraus, daß die Bindungsrichtung der Methylenprotonen "flacher" verläuft, als es einem unverzerrten  $sp^3$ -Hybrid an  $C_{(6)}$  entspricht.

## VI. 2 Dihydrothymin

(Strukturformel s. Abb. 5)

Diese Substanz war unter anderem deshalb von Interesse, da sie als Radiolyseprodukt des Thymins nachgewiesen ist (REUSCHL 1965). Bei ionisierender Bestrahlung von Dihydrothymin erhält man nur im Dosisbereich  $\leq 10^6$  rad vorwiegend das bekannte 8-Linienspektrum des 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikals, während bei höheren Dosen in zunehmendem Maße ein 4-Linienspektrum in den Vordergrund tritt. Abb. 7 zeigt das ESR-Spektrum von Dihydrothymin-Pulver, das mit einer Dosis von  $2 \cdot 10^6$  rad bestrahlt wurde. Man erkennt noch deutlich die äußersten Linien des 5,6-Dihydro-Thymin-(5)-Radikals, welches in diesem Fall durch Wasserstoff-Abspaltung von  $C_{(5)}$  des Dihydrothymins entsteht.

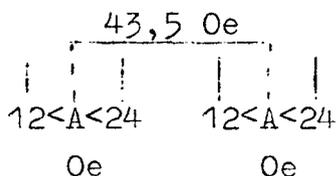
Analyse der Einkristall-Spektren und Bestimmung der Tensor-elemente:

Zum Studium des in Abb. 7 überlagerten 4-Linienspektrums wurden die Kristallplättchen von Dihydrothymin um  $\beta$  paarweise zu einander senkrechte Achsen x, y und z gedreht. Da die kristallografischen Eigenschaften nicht bekannt

waren, erfolgte die Festlegung dieses Achsensystems in Anlehnung an die Plättchen-Gestalt wie beim Cytosin  $H_2O$  (vgl. Abb. 13):

- z in Längsrichtung (Spaltungsrichtung) des Plättchens;
- y  $\perp$  z in der Plättchenebene, die von y und z gebildet wird;
- x  $\perp$  Plättchenebene.

Abb. 8 zeigt ein typisches ESR-Spektrum des mit  $10^7$  rad bestrahlten Kristalls, wobei das Magnetfeld  $H_0$  parallel zur y-Achse verläuft. Bei Betrachtung der Einkristall-Spektren fällt zunächst auf, daß die Linienbreite mit 6 Oe verhältnismäßig hoch liegt. Man kann dafür die Mikrowellensättigung verantwortlich machen, die zweifellos vorliegt, da hier, wie auch bei den anderen Substanzen, die Kleinheit der Kristalle das Arbeiten ohne Hochfrequenz-Abschwächung erforderte. Andererseits kann auch die nicht aufgelöste Hyperfeinstruktur benachbarter Atomkerne eine solche Verbreiterung bewirken. Von diesem Effekt abgesehen, ergab die Analyse der Einkristall-Spektren folgende Struktur des 4-Linienspektrums:



Die Grundaufspaltung von 43,5 Oe ist isotrop und geht auf Hyperkonjugations-Wechselwirkung mit einem  $\beta$ -Proton zurück. Demgegenüber hat die sekundäre Aufspaltung sowohl eine isotrope als auch eine anisotrope Komponente. Wie die Polardigramme für diese Kopplung (Abb. 9) und für den g-Faktor (Abb. 10) zeigen, ist das Koordinatensystem (x, y, z) zugleich Hauptsystem für den Kopplungstensor und den g-Tensor. Aus Abb. 10 folgt für den g-Tensor:

$$|g| = \begin{array}{c|ccc} & x & y & z \\ \hline x & 2,0021 & & \\ y & & 2,0015 & \\ z & & & 2,0028 \end{array}$$

Der Kopplungstensor ergibt sich aus Abb. 9:

$$|A(\text{Oe})| = \begin{array}{|c|} \hline 24 \\ \hline 18 \\ \hline 12 \\ \hline \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline 18 \\ \hline 18 \\ \hline 18 \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline 6 \\ \hline 0 \\ \hline -6 \\ \hline \end{array}$$

isotrope                      anisotrope  
Kopplung

Die beiden größten g-Tensorelemente  $g_x$  und  $g_z$  bilden nach dem in Abschnitt III. 2 Gesagten eine "effektive" Radikalebene, in welche die Hauptwerte  $\pm 6$  Oe der anisotropen Kopplung fallen.

Die Identifizierung und die Struktur des Radikals:

Betrachtet man zunächst den g-Tensor und vergleicht ihn mit den Tensoren von Tab. 2 so fällt auf, daß er sowohl Eigenschaften eines reinen Kohlenstofftensors, wie auch eines  $\dot{\text{C}}\text{OH}$ -Tensors aufweist. Die Werte in der Radikalebene sprechen mehr für ein reines Kohlenstoff-Radikal, wogegen  $g_y$  ein charakteristischer Wert für  $\dot{\text{C}}\text{OH}$ -Fragmente ist. Man vermißt dabei allerdings einen entsprechend hohen Wert von 2,005. Offensichtlich ist das Radikal durch den g-Tensor nicht ausreichend charakterisiert.

Der Kopplungstensor seinerseits schließt ein Radikal der Art  $\text{C}-\dot{\text{C}}-\text{H}_\alpha$  aus, denn er zeigt mit den in großer Zahl veröffentlichten Tensoren für reine  $\text{H}_\alpha$ -Kopplung keinerlei Ähnlichkeit (MORTON 1964). Da ferner das ESR-Spektrum von deuteriertem Dihydrothymin keine Veränderungen gegenüber der Originalsubstanz aufweist, folgt, daß die beiden wechselwirkenden Protonen entweder an C-H-Bindungen sitzen, oder aber im Falle einer Anlagerung überwiegend aus solchen Positionen herrühren.

Diese Tatbestände führen zu dem Schluß, daß doch ein  $\dot{\text{C}}\text{OH}$ -Radikal vorliegt und zwar das sog. 4-Hydroxy-Dihydrothymyl-(4)-Radikal (Abb. 6), welches durch Wasserstoff-Anlagerung an die  $\text{C}_{(4)}=\text{O}$ -Doppelbindung zustande kommt. Die Grundauf-

spaltung von 43,5 Oe geht dabei auf das einzelne Proton an  $C_{(5)}$  zurück, während man den Kopplungstensor dem O-H-Proton zuordnen muß.

Zur Nomenklatur des 4-Linien-Radikals sei bemerkt, daß sie nicht ganz korrekt ist. Die genaue Bezeichnung wäre jedoch äußerst mühevoll, da die entsprechende nicht-radikalische Ausgangsverbindung in der Literatur bislang nicht beschrieben wurde und damit auch kein Trivialname für sie existiert. Entsprechendes gilt auch für die noch zu besprechenden Cytosin- und Purin-Radikale.

Die Spektren sowie die Kopplungskonstanten gestatten eine Abschätzung der Elektronendichte, bestimmter Bindungswinkel und schließlich der Kristallstruktur. Nimmt man plausiblerweise an, daß die Methylgruppe an  $C_{(5)}$  den Winkel  $\theta$  der  $C_{(5)}$ -H-Bindung gegenüber dem Tetraederwert ( $30^\circ$ ) verkleinern wird, so kann man auf Grund der Kopplung dieses Protons von 43,5 Oe die Spindichte an  $C_{(4)}$  abschätzen. Hierzu werden Gl (10) und die Werte  $B_0 = 3,6$  Oe und  $B_1 = 50$  Oe von S. 11 herangezogen. Wegen

$$43,5 = (3,6 + 50 \cdot \cos^2 \theta_{C_{(5)}}) \rho_{C_{(4)}}$$

gilt für den Extremfall  $\rho_{C_{(4)}} = 1$ :

$$\theta_{C_{(5)}} = 27^\circ$$

Da aber höchstens  $\theta_{C_{(5)}} = 0$  sein kann, was  $\rho_{C_{(4)}} = 0,81$  bedeuten würde, ist:

$$0,81 < \rho_{C_{(4)}} < 1$$

Wählt man daher für  $\theta_{C_{(5)}}$  den mittleren Wert von  $15^\circ$ , so folgt als wahrscheinlichster Wert für die Spindichte:

$$\rho_{C_{(4)}} = 0,87$$

Daraus und aus der isotropen Kopplung des O-H-Protons von 18 Oe ergibt sich für den Winkel  $\theta_{\text{O-H}}$  der OH-Bindung, wenn man die Werte  $B_0 = -3,2$  Oe und  $B_1 = 30,5$  Oe von S. 11 zugrunde legt:

$$\theta_{\text{O-H}} \approx 30^\circ$$

Dieser Winkel  $\theta_{\text{O-H}}$  führt unmittelbar auf die Frage der Kristallstruktur. Obwohl über sie noch nichts bekannt ist, läßt sich dennoch einiges aussagen:

Das Fehlen einer Positionsaufspaltung in den ESR-Spektren spricht für eine "antiparallele" Anordnung der Radikale im Kristall, ähnlich wie z.B. beim Cytosin (Abb. 14). Aber auch die Kristallstruktur des Thymins kann zum Vergleich herangezogen werden, denn auch hier ist eine derartige Anordnung der Moleküle nachgewiesen worden (GERDIL 1961). Thymin gehört der Raumgruppe  $P2_1/c$  an, was bedeutet, daß die Moleküle der Elementarzelle durch eine 2-zählige Schraub-symmetrie mit anschließender Gleit-Spiegelung längs der kristallografischen c-Achse verknüpft sind. Die Schraubachse wird bei der hier vorliegenden monoklinen Kristallklasse allgemein mit der kristallografischen b-Achse identifiziert. Die bevorzugte Anordnung der Pyrimidin-Basen in parallelen Bändern mit Gleit-Spiegelsymmetrie begünstigt die Ausbildung möglichst vieler Wasserstoff-Brückenbindungen sowohl zwischen Nachbarmolekülen als auch zu den Kristallwasser-Molekülen. Da sich das Symmetrie-Element der Gleit-Spiegelung außer in einer Orientierungsumkehr auch in einer Stufung der Molekül-Bänder auswirkt, ist ein Winkel  $\theta_{\text{O-H}}$  des Radikals von  $30^\circ$  ohne weiteres verständlich. Auf Grund dieser Überlegungen müßte man daher auch das Dihydrothymin der Raumgruppe  $P2_1/c$  zuordnen.

VI. 3 Cytosin · H<sub>2</sub>O

(Strukturformel s. Abb. 11)

Einkristall-Plättchen von Cytosin Monohydrat erhält man ziemlich leicht durch langsames Verdunsten einer wässrigen Lösung. An ihnen wurde die Struktur des Dublett-Spektrums mit der Aufspaltung  $< 20$  Oe untersucht, welches auf S. 3 beschrieben ist. Für die ESR-Messungen erwies es sich wiederum als zweckmäßig, die Achsen x, y, und z in Anlehnung an die äußere Kristallform und an die von ROSE (1955) angegebenen kristallografischen Achsen a, b und c zu wählen (Abb. 13), und zwar ist:  $z = b$ ,  $y = c$  und  $x \perp (x, y)$ .

Ergebnisse:

Abb. 15 zeigt die Polardiagramme der Dublett-Aufspaltung des Cytosin-Spektrums. Der Kopplungstensor ist im Koordinatensystem (x.y.z) offensichtlich diagonal und lautet:

$$|A(\text{Oe})| = \begin{vmatrix} 9,3 & & \\ & 12,8 & \\ & & 5,8 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 9,3 & & \\ & 9,3 & \\ & & 9,3 \end{vmatrix} + \begin{vmatrix} 0 & & \\ & 3,5 & \\ & & -3,5 \end{vmatrix}$$

isotrope                      anisotrope  
Kopplung

Hingegen ist der g-Tensor, wie aus Abb. 16 hervorgeht, im (x,y,z)-System nicht diagonal. Aus diesem Grunde ist in Abb. 16 die Winkelabhängigkeit von  $g^2$  aufgetragen. Berechnet man die Elemente des Tensors  $|G| = |g^2|$  nach Gln. (11) und (12), wobei aus Abb. 16 die Werte  $A_z = 0,0096$ ,  $(g^2)_{xx} = 4,0060$ ,  $(g^e)_{yy} = 4,0232$  und  $(g^2)_{zz} = 4,0172$  zugrunde gelegt werden, so ergibt sich:

$$|G| = \begin{vmatrix} 4,0060, & 0,0043, & 0 \\ 0,0043, & 4,0232, & 0 \\ 0, & 0, & 4,0172 \end{vmatrix}$$

Der Tensor hat damit die Gestalt von Gl. (13). Die Transformation  $|T|$ , die  $|G|$  diagonalisiert, sowie der Drehwinkel  $\delta$  um die z-Achse, berechnen sich nach Gln. (14) und (15) zu:

$$|T| = \begin{vmatrix} 0,973, & -0,233, & 0 \\ 0,233, & 0,973, & 0 \\ 0, & 0, & 1 \end{vmatrix}$$

und:

$$\delta \approx 13,5^\circ$$

Es handelt sich also um eine kleine Drehung, die infolgedessen auch die Diagonalelemente des g-Tensors nur wenig verändert. Aus Gln. (16) und (17) folgt:

$$|g| = \begin{vmatrix} 2,0015 & & \\ & 2,0059 & \\ & & 2,0043 \end{vmatrix}$$

Ein charakteristisches Einkristall-Spektrum, bei dem das Magnetfeld parallel zur y-Achse verläuft, ist in Abb. 17 dargestellt. Vergleicht man die ESR-Spektren von polykristallinem Cytosin (Abb. 18) mit denen der deuterierten Substanz (Abb. 19), so bemerkt man bei der letzteren eine deutliche Linien-Verschmälerung, die mit dem Verschwinden der reinen Dublett-Struktur verbunden ist. Es war jedoch nicht möglich, das reine Deuterium-Triplett zu erhalten.

Art und Struktur des Cytosin-Radikals:

Der g-Tensor charakterisiert dieses Radikal eindeutig als  $\dot{C}OH$ -Radikal (vgl. Tab. 2). Die Radikalebene ist um  $13,5^\circ$  aus der (y,z)-Ebene herausgedreht. Diese Drehung um die z-Achse ergab sich aus der Hauptachsentransformation des g-Tensors. In die (x,y)-Ebene fallen auch die von Null verschiedenen Elemente des anisotropen Kopplungstensors. Die Ergebnisse des Deuterierungsversuches zeigen, daß kein Radikal-Ion vorliegt, bei dem das austauschbare Wasserstoffatom an  $N_{(1)}$  tautomer an die benachbarte  $C_{(2)} = O$ -Doppelbindung umlagert ist. Es muß vielmehr ein Wasser-

stoff-Anlagerungsradikal angenommen werden, bei dem der anlagernde Wasserstoff nur zum Teil aus C-H-Bindungen stammt. Die experimentellen Daten sprechen damit für das 2-Hydroxy-Cytosyl-(2)-Radikal (Abb. 12), wobei wegen der Nomenklatur auf die Bemerkung von S. 26 verwiesen werden muß. Der in der Radikalebene liegende Wasserstoff von  $N_{(1)}$  liefert keine auflösbare Hyperfeinstruktur.

Auch beim Cytosin-Radikal läßt sich die Spindichte  $\rho$  an  $C_{(2)}$  und der Winkel  $\theta$  der O-H-Bindung abschätzen. Dazu bemerkt man zunächst, daß man annähernd die Kopplungstensoren für das Cytosin-Radikal aus demjenigen des Dihydrothymin-Radikals (Abschnitt VI. 2) durch Multiplikation mit dem Faktor 0,54 erhält. Es erscheint daher gerechtfertigt anzunehmen, daß die geringere Kopplung beim Cytosin durch eine um den Faktor 0,54 verkleinerte Spindichte an  $C_{(2)}$  zustande kommt. Legt man den Wert von 0,87 des Dihydrothymin-Radikals zugrunde, so erhält man für das Cytosin-Radikal:

$$\rho_{C_{(2)}} \sim 0,47$$

Für den Winkel  $\theta$  gilt nach wie vor:

$$\theta_{O-H} \approx 30^\circ$$

Um die Zusammenhänge zwischen den ESR-Ergebnissen und der Kristallstruktur des Cytosin-Monohydrats besser zu verstehen, sei kurz auf dessen wichtigste kristallografische Eigenschaften eingegangen. JEFFREY und KINOSHITA (1963) bestimmten die Raumgruppe zu  $P2_1/c$ . Die Dimensionen der Elementarzelle, die 4 Moleküle Cytosin in der normalen tautomeren Form (Abb. 11) enthält, lauten:

$$\begin{aligned} a &= 7,801 \pm 0,005 \text{ \AA} \\ b &= 9,844 \pm 0,007 \text{ \AA} \\ c &= 7,683 \pm 0,006 \text{ \AA} \\ \beta &= \angle (a,c) = 99^\circ 42' (\pm 4') \\ &\text{(Monokliner Winkel)} \end{aligned}$$

Die Cytosin-Moleküle werden über Wasserstoff-Brücken zu parallelen Bändern verknüpft, was im Prinzip in Abb. 14 dargestellt ist. Benachbarte Bänder, wie auch aufeinanderfolgende Moleküle eines Bandes sind durch die  $2_{1/c}$  Symmetrie-Operation miteinander verbunden, was eine Stufung der Bänder bewirkt. Ein System von Wasserstoff-Brücken vernetzt die Bänder sowohl untereinander, als auch mit den Molekülen des Kristallwassers. Für die Elektronenspin-Resonanz bedeutet diese "antiparallele" Anordnung der Moleküle, daß beim Einkristall keine Positionsaufspaltung beobachtet wird.

Nach diesen Ausführungen über die Kristallstruktur des Cytosin Monohydrates läßt sich der Winkel  $\theta_{O-H} \approx 30^\circ$  ohne weiteres verstehen. Leider ist es anhand der Mitteilungen von JEFFREY und KINOSHITA nicht möglich, Radikal- und Molekülebene zu vergleichen. Es kann also z.B. nicht eindeutig geschlossen werden, ob durch die Radikalbildung die Molekülebene gedreht worden ist, was immerhin denkbar wäre. Auch ist nicht ganz klar, weshalb beim Cytosin-Radikal ein im Sinne von Tab. 2 normaler g-Tensor vorliegt, während beim g-Tensor des Dihydrothymins nur der kleinste Hauptwert auf ein COH-Radikal hinweist. Möglicherweise spielen hier Mesomerie-Effekte eine Rolle.

#### VI. 4 Adenosin·HCl

(Strukturformel s. Abb. 20)

Säulenförmige Kristalle von Adenosin Hydrochlorid erhält man durch langsames Abkühlen einer schwach salzsauren Lösung von Adenosin. Die Dimensionen der Elementarzelle lauten (SCHNEIDER 1966):

$$\begin{aligned} a &= 6,68 \pm 0,03 \text{ \AA} \\ b &= 16,9 \pm 0,07 \text{ \AA} \\ c &= 6,42 \pm 0,03 \text{ \AA} \\ \beta &= \angle (a,c) = 115,5 \pm 0,5^\circ \\ &\text{(Monokliner Winkel)} \end{aligned}$$

Da die Nukleoside optisch aktiven Zucker enthalten, der nicht mit seinem Spiegelbild kongruent ist, können die Gitterpunkte des Einkristalls nicht durch orientierungs-umkehrende Symmetrie-Operationen, wie Spiegelung und Gleit-spiegelung verknüpft sein. Dementsprechend gehört das Adenosin·HCl der Raumgruppe  $P2_1$  an, in der nur zweizählige b-Schraub-Symmetrie vorliegt. Die Festlegung des ESR-Achsensystems (x, y, z) erfolgte, wie in Abb. 24 dargestellt.

#### Ergebnisse:

Die ESR-Spektren bestehen, abgesehen von einem noch zu besprechenden neutralen Teil, aus einem Triplet mit dem Amplitudenverhältnis 1:2:1. Es entsteht durch Wechselwirkung des ungepaarten Spins mit 2 äquivalenten Protonen. Die Kopplung ist isotrop und beträgt:

$$A = 39,5 \pm 0,5 \text{ Oe.}$$

Während für den Fall, daß das Zeeman-Feld  $H_0$  parallel zur x-Achse verlief, stets eindeutige Spektren erhalten wurden (Abb. 22), trat eine Linienverdopplung ein, sobald eine der Achsen y oder z dem Feld parallel lag. Die Aufspaltung in 2 Komponenten betrug 17 Oe. Ihre Winkelabhängigkeit widersprach jedoch einer möglichen Zuordnung zum Kopplungstensor einer Sekundär-Struktur. Durch die Annahme, daß es sich um eine Positionsaufspaltung handelt, konnte das Winkelverhalten widerspruchsfrei erklärt werden, wie im folgenden gezeigt wird. Ein g-Tensor ließ sich nur dann bilden, wenn man im Fall zweier magnetisch verschiedener Positionen, nur die g-Faktoren der bei niedrigem Feld erscheinenden Komponente berücksichtigte. Die Komponente bei hohem Feld ergab keinen widerspruchsfreien Tensor. Die zugehörigen g-Faktoren lagen überdies zum Teil viel zu tief ( $g \approx 2,0010$ ) um in diesem Zusammenhang deutbar zu sein. Der physikalisch allein sinnvolle Tensor der ESR-Linien bei niedrigem Feld ist im System (x, y, z) diagonal. Die Polardiagramme sind

in Abb. 23 zusammengestellt. Man liest aus ihnen annähernd folgenden g-Tensor ab:

$$|g| = \begin{vmatrix} 2,0024 & & \\ & 2,0038 & \\ & & 2,0038 \end{vmatrix}$$

In Tab. 4 sind ausgezeichnete Orientierungen angegeben, bei denen eine bzw. zwei magnetisch unterscheidbare Positionen erscheinen. Außer der x-Achse gibt es noch 2 zu einander senkrechte Richtungen, längs denen nur eine Position beobachtet wird: die beiden Winkelhalbierenden der Achsen y und z. Hiernach läßt sich auf eine Anordnung der Radikale im Einkristall schließen, wie sie in Abb. 25 dargestellt ist, oder die ihr zumindest ähnlich ist. Die Radikalebene ist hier als Kreis und deren Spur durch einen Strich angedeutet.

Die Diskussion und die Struktur-Aufklärung des Triplett-Radikals, die durch die Ergebnisse von Desoxyadenosin und Desoxyguanosin erleichtert werden, sind in einen besonderen Abschnitt (VI. 7) verlegt.

#### VI. 5 Desoxyadenosin·H<sub>2</sub>O

(Strukturformel s. Abb. 26)

Beim Abkühlen oder Verdunsten einer wässrigen Lösung von Desoxyadenosin erhält man klare Kristallplättchen von Desoxyadenosin Monohydrat, die sich bei ionisierender Bestrahlung grünlich verfärben. Die Raumgruppe wurde in einer sehr genauen Untersuchung von WATSON, SUTOR und TOLLIN (1965) zu P2<sub>1</sub> bestimmt. In der Elementarzelle des monoklinen Einkristalls befinden sich 2 Moleküle Desoxyadenosin, die sowohl untereinander als auch mit den Kristallwasser-Molekülen über Wasserstoff-Brücken verbunden sind. Die Normalen von Zucker- und Purin-Ring bilden einen Winkel von 69°.

Der bestrahlte Kristall liefert in vielen Orientierungen verhältnismäßig komplizierte und schwache ESR-Spektren. Auch hier konnte das beim Adenosin gefundene Triplett-

Spektrum verfolgt werden, dessen isotrope Kopplung hier den Wert

$$A = 40 \pm 0,5 \text{ Oe}$$

hat. Da die Spektren in vielen Einzelheiten noch unklar sind, sei nur eine Orientierung angegeben, bei der die wesentlichen Merkmale des ESR-Signals besonders deutlich hervortreten (Abb. 28). Neben dem Triplett-Spektrum, das bei einem g-Faktor von 2,0026 erscheint, erkennt man, daß der Zentralteil aus mehreren Komponenten besteht, über dessen Struktur jedoch noch nichts ausgesagt werden kann. Das Magnetfeld verläuft in Abb. 28 parallel zur z-Achse, die, wie beim Cytosin und beim Dihydrothymin in die Längsrichtung des Plättchens gelegt wurde. Die ESR-Linien des Desoxyadenosin sind durch Mikrowellen-Sättigung stark verbreitet. Für die Interpretation des Triplett-Spektrums sei wieder auf Abschnitt VI. 7 verwiesen.

#### VI. 6 Desoxyguanosin·HCl

(Strukturformel s. Abb. 29)

Die Kristallisation erwies sich hier als besonders schwierig und langwierig. Bei langsamer Abkühlung einer gesättigten schwach salzsauren Desoxyguanosin-Lösung entstanden im Lauf eines Monats nur kleine und äußerst schwierig zu handhabende Kristallnadeln von Desoxyguanosin Hydrochlorid. Nach den Untersuchungen von SCHNEIDER (1966) gehören auch diese Kristalle der monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  an.

Da die Kristalle sehr klein waren und zum Teil schlecht ausgeprägte Flächen zeigten, war die Justierung und Handhabung sehr erschwert, so daß die Elemente des g-Tensors nicht genau bestimmt werden konnten. Sie zeigen jedoch weitgehende Ähnlichkeit mit den g-Tensorelementen des Adenosin Hydrochlorids (Abschnitt VI. 4).

Tabelle 4: Magnetisch unterscheidbare Position im Adenosin · HCl-Einkristall

Ebene des Magnetfeldes	Achse parallel zum Magnetfeld	Anzahl der Positionen	g-Faktor
(z,x)	z	2	2,0038
	x	1	2,0024
(x,y)	x	1	2,0024
	y	2	2,0038
(y,z)	y	2	2,0038
	Winkelhalbierende von y und z	1	2,0038
	z	2	2,0038
	Winkelhalbierende von z und -y	1	2,0038

Um so überraschender war, daß die kleinen Kristalle nach Bestrahlung sehr starke ESR-Signale lieferten. Sie werden wieder von dem charakteristischen Triplett beherrscht, wenn man von einer zusätzlichen zentralen Einzellinie absieht. Ähnlich wie beim Adenosin-HCl gibt es Orientierungen, in denen eine und zwei magnetisch unterscheidbare Positionen erscheinen (Abb. 31a und 31b). Der isotrope Abstand der Triplett-Linien beträgt:

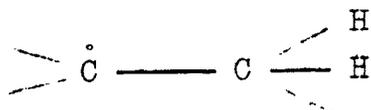
$$A = 35 \pm 1 \text{ Oe.}$$

Alle Anzeichen sprechen dafür, daß auch hier das gleiche Radikal wie bei den Adenin-Nukleosiden gebildet wird.

## VI. 7 Das Triplett-Spektrum der Purin-Derivate

Beim Übergang von den reinen Basen zu den Nukleosiden tritt der Zucker als zusätzliche strahlenempfindliche Komponente in Erscheinung. Diese Tatsache kann die Identifizierung der entstandenen Radikale erschweren, die nun nicht mehr notwendig Basen-Radikale zu sein brauchen. Zwar wurde beim Thymidin festgestellt (VI. 1), daß ausschließlich das 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikal entsteht, wobei nach allem, was wir wissen, das anlagernde Wasserstoffatom aus dem Zucker stammt, von welchem ein nicht-radikalischer Rest zurückbleibt. Man kann nun für alle Nukleoside eine Arbeitshypothese aufstellen, indem man generell annimmt, daß der bei der Radiolyse des Zuckers freiwerdende atomare Wasserstoff an eine Doppelbindung der Base anlagert und dadurch ein Radikal bildet, oder, schärfer formuliert, daß die im festen Zustand entstehenden stabilen Basen-Radikale überwiegend Wasserstoff-Anlagerungs- bzw. Wasserstoff-Abstraktions-Radikale sind. Um diese Hypothese auch im Falle der Purin-Verbindungen zu prüfen, wird im folgenden untersucht, welches Radikal dem Triplett-Spektrum der Purin-Nukleoside und Nukleotide zugrunde liegt.

Stützt man sich auf den g-Tensor des Adenosin Hydrochlorids und berücksichtigt außerdem, daß im Triplett-Spektrum keine  $N^{14}$ -Hyperfeinstruktur auftritt, so wird man dem Radikal mit guter Berechtigung folgende Struktur zuschreiben:



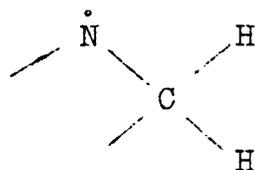
wobei die beiden Protonen äquivalent sind. Diese Struktur würde auch die Protonen-Kopplung von 35 Oe (Desoxyguanosin-HCl) bzw. 40 Oe (Desoxyadenosin und Adenosin) und das negative Ergebnis des Deuterierungs-Experiments, das keine Änderung des ESR-Spektrums erbrachte, befriedigend erklären. An welcher Stelle der Purin-Nukleoside und -Nukleotide könnte aber ein solches Radikal entstehen?

Zieht man zunächst die Bildung eines Basen-Radikals in Betracht, so verbleibt offenbar nur die Möglichkeit, die Radikalstelle an der Position  $C_{(4)}$  bzw.  $C_{(5)}$  des Pyrimidin-Ringes anzunehmen. Dies würde die Öffnung oder gar die Zerstörung des Imidazol-Ringes und ferner die Anlagerung von 2 Wasserstoffatomen voraussetzen, Reaktionen also, die in mehreren Schritten ablaufen. Abgesehen von der Unwahrscheinlichkeit solcher Reaktionen in der festen Phase, müßten, da dieses Radikal mit einer Ausbeute von  $G \approx 1$  in Purin-Nukleosiden entsteht (MÜLLER 1964), für die Zwischenprodukte der Reaktionskette um mehrere Größenordnungen höhere Reaktionsraten gegenüber Wasserstoffatomen angenommen werden, als für die Base selbst. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß ein solches Pyrimidin-Radikal gebildet wird.

Die Annahme eines Zucker-Radikals stößt auf ähnliche Schwierigkeiten, die noch durch den Befund vergrößert werden, daß das beobachtete Radikal offenbar unabhängig von der Art des Zuckers gebildet wird. Die einzigen, möglicherweise äquivalenten Protonen des Zuckers sind a priori die der  $CH_2OH$ -Gruppe. Durch Wasserstoff-Abspaltung an der

Position  $C'_{(4)}$  (vgl. z.B. Abb. 29) könnte hier eine Radikalstelle entstehen, wobei aber zu fordern wäre, daß das Proton an  $C'_{(3)}$  durch eine Sekundär-Reaktion verschwindet. Obwohl derartige Reaktionen in gelöstem Zustand gefunden worden sind (KECK, HAGEN und FRIEBOLIN 1966), sind sie im hiesigen Fall, schon aus sterischen Gründen, unwahrscheinlich. Damit scheidet auch die Möglichkeit eines Zucker-Radikals aus.

Es erhebt sich angesichts dieser Schwierigkeiten die Frage, ob nicht auch ein Radikal des folgenden Typs vorliegen kann,



wobei der  $g$ -Tensor verfälscht, und die  $N^{14}$ -Hyperfeinstruktur durch irgendeinen Umstand ausgefallen ist. Dazu seien zunächst die Experimente von HERAK und GORDY (1965) erwähnt, die ein ESR-Triplett von ca. 39 Oe bei einem  $g$ -Faktor von ungefähr 2,0035 erhielten, nachdem sie Purin-Basen einer Wasserstoff-Gasentladung angesetzt hatten. Die Autoren registrierten andererseits ein Dublett von 39 Oe Aufspaltung, dessen Linien durch Wechselwirkung mit einem Deuteron stark verbreitert waren, wenn sie eine Deuterium-Entladung benutzten. Sie schlossen daraus, daß durch die Bombardierung der Wasserstoff an eine Position anlagerte, an der bereits ein Wasserstoffatom gebunden ist und postulierten die in Abb. 21 bzw. 30 dargestellten Stickstoff-Radikale, ohne jedoch die  $N^{14}$ -Hyperfeinstruktur nachweisen zu können.

In diesem Zusammenhang sei bemerkt, daß CHECUCCI, DEPIREUX und DUCHESNE bei Bestrahlung von 9-Äthyl-Guanin ebenfalls ein Triplett mit einer Kopplung von 35 Oe erhielten. Das zugrunde liegende Radikal ist mit großer Wahrscheinlichkeit das gleiche, wie bei den Experimenten von

HERAK und GORDY. Die Tatsache, daß ein Stickstoff-Radikal weder durch seinen g-Tensor, noch durch die Stickstoff-Hyperfeinstruktur identifiziert werden kann, ist zwar ungewöhnlich, kann aber durch wenigstens 2 bisher veröffentlichte Experimente belegt werden:

Einen mittleren g-Faktor von 2,0034 und das Fehlen einer  $N^{14}$ -Hyperfeinstruktur beobachteten HYDE und FREEMAN (1961) an dem nach Bestrahlung von Ammoniumperchlorat-Einkristallen erzeugten  $NH_3^+$ -Radikal. Die Autoren registrierten die ESR-Spektren, wobei sie den Kristall langsam von 380 °K auf 90 °K abkühlten. Während sie bei 380 °K das Stickstoff-Triplett mit der sekundären Quartett-Struktur der 3 äquivalenten Protonen erhielten, verblieb bei 170 °K nur das mittlere Quartett, während die beiden äußeren, zu den Spinquantenzahlen  $m = \pm 1$  des Stickstoffes gehörenden Quartette, praktisch verschwunden waren. HYDE und FREEMAN machten die bei sinkender Temperatur stufenweise einfrierende Rotation des Radikals für den Ausfall der  $N^{14}$ -Kopplung verantwortlich.

Ein ähnliches Ergebnis erzielten AL-NAIMY, MOORTHY und WEISS (1966) mit bestrahlten, gefrorenen Ammoniak-Wasser-Systemen. Hier wird das Radikal  $NH_2$  erzeugt, dessen Rotation durch die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken mit den Wassermolekülen behindert ist. Die Folge davon ist wieder ein Ausfallen der  $N^{14}$ -Kopplung, die jedoch sofort wieder auftritt, wenn man in einer Argon-Matrix arbeitet, in der kein Wasserstoff-Brückensystem möglich ist.

Damit ist sehr wahrscheinlich gemacht, daß tatsächlich Radikale vom 7,8-Dihydro-Adenyl-(Guanyl)-(7)-Typ vorliegen, deren Rotation, wie ohne weiteres erklärlich ist, behindert ist. Besondere Bedeutung erhält diese Tatsache noch durch die Berechnungen von PULLMAN und MANTIONE (1965). Die von den Autoren für die vorliegenden Radikale berechneten Spindichten sind in den entsprechenden

Abbildungen (21 und 30) eingetragen. Bemerkenswert ist, daß sich die Spindichten an  $N_{(7)}$  von 0,39 beim Guanin-Radikal und 0,43 beim Adenin-Radikal ziemlich genau wie die in dieser Arbeit gemessenen Kopplungen von 35 bzw. 39,5 Oe verhalten, was als Bestätigung dieser Spindichten angesehen werden kann. Andererseits können diese Werte herangezogen werden, um die bisher nicht bekannte Kopplungskonstante  $B_1$  für Stickstoff-Radikale abzuschätzen. Da nämlich die hyperkonjugative Wechselwirkung durch eine Beziehung der Art

$$A = (B_0 + B_1 \cos^2\theta) \rho$$

beschrieben wird (vgl. Abschnitt III. 1), wobei  $B_1 \gg B_0$  ist, folgt:

$$B_1 \approx \frac{A}{\rho \cdot \cos^2\theta}$$

Aufgrund der Winkelverhältnisse beim Desoxyadenosin (Abb. 32) erscheint es gerechtfertigt, an  $C_{(8)}$  in erster Näherung Tetraeder-Bindung anzunehmen. Es ist daher

$$\theta \approx 30^\circ \text{ und } \cos^2\theta = 0,75.$$

Hieraus folgt mit den entsprechenden Wertepaaren A und  $\rho$ :

$$B_1 \approx 122 \text{ Oe.}$$

Die Kenntnis dieser Kopplungskonstanten kann für die Identifizierung weiterer Stickstoff-Radikale von Bedeutung sein.

## VI. 8 Das ESR-Singulett der Purin-Derivate

Bestrahlt man reine Purin-Basen oder auch die Basen-analoga Xanthin und Hydroxanthin, so erhält man im wesentlichen eine Einzellinie (KÖHNLEIN 1963), die auch in den ESR-Spektren der entsprechenden Nukleoside zu finden ist. Man könnte zunächst daran denken, die Singulett-Linie den Radikal-Kationen bzw. -Anionen der Purin-Basen zuzuordnen. Freilich ist es schwer vorstellbar, daß geladene Radikale

in festen organischen Substanzen längere Zeit stabil sind, wie dies z.B. in Redox-Systemen möglich ist. Hält man trotzdem an der Möglichkeit geladener Radikale fest, so zeigt Abb. 33, welche die von BAUDET, BERTHIER und PULLMAN (1962) berechneten Spin-Verteilungen für das positive und negative Adenin- bzw. Guanin-Radikal enthält, daß sie keineswegs ESR-Singulett ergeben. Eine gewisse Ausnahme bildet das positive Guanin-Radikal, das offenbar nur eine geringe, sicher nicht auflösbare Hyperfeinstruktur zeigt.

Die wahrscheinlichste Reaktion, nach der sich ein Singulett-Radikal mit einem G-Wert von 0,1 . . . 1,7 bilden kann, besteht in der Abspaltung von atomarem Wasserstoff. Da die Singulett-Linie für die Purin-Derivate charakteristisch ist, hat man die Radikalstelle am Imidazol-Ring ihres kondensierten Ringsystems zu suchen. Da ferner eine Radikalstelle an einer Doppelbindung sicher nicht sehr stabil ist, andererseits aber das Singulett-Spektrum praktisch bis zur Zersetzungstemperatur des entsprechenden Nukleosids beobachtet wird, verbleibt nur die Möglichkeit, Wasserstoff-Abspaltung von der Position N<sub>(9)</sub> anzunehmen (Abb. 27). Damit ist auch der Mechanismus klar, nach dem das Singulett-Radikal in den Nukleosiden entstehen kann, nämlich durch Trennung der N-Glycosid-Bindung zum Zucker.

Nach dem in Abschnitt VI. 7 gesagten fällt es nicht schwer, das Fehlen der N<sup>14</sup>-Hyperfeinstruktur zu verstehen, denn auch hier ist die Rotation des Radikals natürlich behindert. Der  $\beta$ -ständige Wasserstoff an C<sub>(8)</sub> erscheint im ESR-Spektrum nicht, da er in der Radikalebene liegt ( $\theta = \pi/2$ ).

Für eine Radikalstelle an N<sub>(9)</sub> würde ferner der g-Tensor sprechen, der weitgehend mit demjenigen des Triplett-Radikals (Radikalstelle N<sub>(7)</sub>!) übereinstimmt. Da auch die gleiche Positionsaufspaltung vorliegt, ist das Singulett in den ESR-Spektren der Einkristalle von Adenosin·HCl und Desoxyguanosin·HCl meistens der Zentrallinie des Triplett

überlagert und äußert sich nur in einer Verfälschung des Amplitudenverhältnisses beim Triplett (Abb. 22 und 31).

## VII. Bedeutung für die Strahlenbiologie

Bei der Beurteilung des strahlenbiologischen Inhalts dieser Untersuchungen geht man am besten von der Frage aus, welche Wirkung den identifizierten Radikalen innerhalb der DNS und auch der RNS zugeschrieben werden kann.

Studiert man zunächst den Kristallaufbau der reinen Nukleinsäure-Basen (z.B. Cytosin), so sind bereits Gesetzmäßigkeiten erkennbar, die auch bei der DNS anzutreffen sind. Hierher gehören beispielsweise die antiparallele Lagerung der Basen zu Bändern unter Ausbildung eines ausgedehnten Systems von Wasserstoff-Brücken, wodurch bereits die Basen-Paarung der DNS angedeutet ist. Die Tatsache, daß im Watson-Crick-Modell der DNS nicht alle im Kristall betätigten Wasserstoff-Brücken der Basen ausgebildet sind, schließt nicht aus, daß ihnen nicht doch eine stabilisierende Funktion, etwa durch Ausbildung zu Struktur-Proteinen zukommt. Es ist daher sicher gerechtfertigt anzunehmen, daß jeder Treffer im Wasserstoff-Brückensystem zumindest einen potentiellen Strahlenschaden darstellt. In diesem Sinne ist klar, daß alle  $\dot{\text{C}}\text{OH}$ -Radikale, die durch Wasserstoff-Anlagerung an eine  $\text{C}=\text{O}$ -Doppelbindung entstehen, die Stabilität der DNS vermindern, weil durch sie die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken behindert ist. Im Falle des 2-Hydroxy-Cytosyl-(2)-Radikals ist darüber hinaus die Basen-Paarung zum Guanin beeinträchtigt, ein Schaden, der eine Mutation bedeuten könnte.

In ähnlicher Weise dürfte die Wirkung der  $\dot{\text{N}}$ -Radikale bei den Purin-Basen zu erklären sein, da ja auch die Stickstoff-Atome des Basen-Gerüsts zur Ausbildung von Wasserstoff-Brücken befähigt sind. Strahlenbiologisch besonders bedeutsam ist zweifellos der Fall, daß das  $\dot{\text{N}}$ -Radikal durch Zerstörung der N-Glycosid-Bindung zustande

kommt, was die Abtrennung der Base aus dem Nukleinsäure-Molekül zur Folge hat. Weiterreichende Spekulationen über die Wirkung solcher Radikalstellen an der DNS erscheinen in diesem Zusammenhang nicht angebracht, da hierfür die unter in-vivo-Bedingungen stattfindenden Reaktionen berücksichtigt werden müßten.

Neben den  $\dot{\text{C}}\text{OH}$ - und den  $\dot{\text{N}}$ -Radikalen entstehen in bestrahlter DNS auch "reine" Kohlenstoff-Radikale, wie z.B. das 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikal. Auf den ersten Blick scheint es, als ob diese Spezies keinen Einfluß auf Struktur und Stabilität der DNS ausüben. Ihre mutagene oder letale Wirkung tritt wahrscheinlich erst nach dem Ablauf von Sekundär-Reaktionen zutage.

Viele Wasserstoff-Anlagerungsradikale, insbesondere jene, bei denen der Wasserstoff am Kohlenstoff addiert wird, lassen sich gut darstellen, indem man die Substanz einer Wasserstoff-Gasentladung aussetzt. Dies wurde für verschiedene Nukleinsäure-Basen z.B. von HERAK und GORDY (1965) gezeigt. Die selektive Erzeugung dieser Radikale durch  $\gamma$ -Bestrahlung unter hohem Wasserstoffdruck gelingt jedoch im allgemeinen nicht. Ein diesbezüglicher Versuch (50 at Wasserstoff) wurde im Rahmen dieser Arbeit an den Basen Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin und Uracil mit negativem Ergebnis durchgeführt. Dies zeigt die Überlegenheit der Gasentladung hinsichtlich der Ausbeute an Wasserstoff-Atomen.

Die wichtige Rolle der Wasserstoff-Atome bei der Radikalbildung kann in etwas größerer Annäherung an die biologische Realität auch noch durch die Bestrahlung molekularer Mischungen einer Base (z.B. Thymin) und eines Zuckers (z.B. Desoxyribose) herausgestellt werden. Hierbei bildet sich, wie MÜLLER (1966) zeigen konnte, unter bestimmten Bedingungen überwiegend das 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikal. Dadurch wird erneut die Vorstellung bestätigt, daß der anlagernde atomare Wasserstoff vorwiegend aus dem Zuckerrest der Nukleinsäure-Bausteine stammt.

Damit tritt eine für die Strahlenempfindlichkeit sehr wichtige Komponente der Nukleinsäuren in den Vordergrund der Überlegungen: der Zucker. Dies ist um so bemerkenswerter, als seine Strahlenempfindlichkeit im gebundenen Zustand nicht aus dem ESR-Spektrum erschlossen werden kann, sondern aus dem radiolytisch in Freiheit gesetzten Wasserstoff. Es gibt einige Arbeiten (z.B. JACOBS 1962), aus denen hervorgeht, daß Wasserstoff, zusammen mit Wasser und Kohlendioxid in großen Mengen bei der Radiolyse verschiedener Zucker entsteht. Will man möglichst vielen Befunden über die Radiolyse von Nukleinsäure-Bausteinen, besonders in der festen Phase, gerecht werden, so muß man den Zucker als die wesentlich strahlenempfindlichere Komponente betrachten, wogegen der Angriff der Wasserstoff-Atome auf die stabilen konjugierten Ringsysteme der Basen "lediglich" freie Radikale liefert. Es kann durchaus sein, daß dem Basenschaden gegenüber einem viel häufigeren Zuckerschaden nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Man stellt sich ferner leicht vor, daß Zuckerschäden bei Brüchen der Polynukleotid-Ketten eine Rolle spielen, wobei aber nicht ausgeschlossen werden darf, daß hierfür auch Schäden der Phosphat-Gruppen verantwortlich sind, über die verhältnismäßig wenig bekannt ist.

Abschließend läßt sich sagen, daß die hier durchgeführten Untersuchungen, was die Elektronenspin-Resonanz betrifft, die Hypothese bestätigen, nach der in den Spektren der Nukleoside überwiegend Basenradikale in Erscheinung treten, deren Bildung auf die Anlagerung oder die Abspaltung von atomarem Wasserstoff zurückgeht. Neue Aspekte über die Wirkung ionisierender Strahlung würden sich ergeben, wenn man neben den Radikalen auch die molekularen Radiolyse-Produkte mit berücksichtigen würde. Insbesondere wäre z.B. die Identifizierung der Zuckerreste von großer Wichtigkeit. Es ist zu erwarten, daß sich durch solche und ähnliche Versuche für die Strahlenbiologie klarere Vorstellungen über den Ablauf der physikalisch-chemischen Reaktionen bei der Radiolyse der Nukleinsäuren ergeben.

### VIII. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden durch ESR-Untersuchungen an bisher nicht untersuchten bestrahlten Einkristallen von Nukleinsäure-Bausteinen, einige noch unbekannte Radikale identifiziert. Die Messungen wurden bei 35 GHz an Einkristallen von Dihydrothymin, Cytosin, Adenosin Hydrochlorid, Desoxyadenosin und Desoxyguanosin Hydrochlorid durchgeführt. Die Zuordnung der ESR-Spektren erfolgte aufgrund der gemessenen g- und Kopplungstensoren. Es wurde ferner auf Zusammenhänge zwischen der Struktur der ESR-Spektren und den kristallografischen Befunden eingegangen und darüber hinaus Berechnungen zur Spindichte und bestimmten Bindungswinkeln durchgeführt. Dem experimentellen Teil ist eine kurze theoretische Abhandlung über die Besonderheiten der Elektronenspin-Resonanz bei hohen Frequenzen sowie der Auswerte-Verfahren für Einkristall-Spektren vorangestellt. Die strahlenbiologische Bedeutung der identifizierten und bislang in der Strahlenbiologie nicht beschriebenen  $\dot{\text{C}}\text{OH}$ - und  $-\dot{\text{N}}$ -Radikale wird diskutiert.

IX. Literaturverzeichnis

AL-NAIMY, B.S., MOORTHY, P.N. und WEISS, J.J.

An electron spin resonance study of the  $\gamma$ -radiolysis and the photolysis of frozen ammonia-water systems.

J. Phys. Chem. 70, 3654-60 (1966)

ATHERTON, N.M. und WHIFFEN, D.H. (I)

An electron spin resonance study of a  $\gamma$ -irradiated single crystal of glycollic acid.

Mol. Phys. 3, 1-15 (1960)

ATHERTON, N.M. und WHIFFEN, D.H. (II)

Electron resonance study of the carboxylate-hydroxy-methyl-radical-ion.

Mol. Phys. 3, 103-4 (1960)

BAUDET, J., BERTHIER, G. und PULLMAN, B.

Recherches théorétiques sur la répartition des densités de spin dans les molécules d' intérêt biochimique.

Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 254, 762-4 (1962)

BLUMENFELD, L.A., WOJEWODSKI, W.W. und SEMJONOW, A.G.

Die Anwendung der Paramagnetischen Elektronenresonanz in der Chemie.

Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M. (1966)

CHECUCCI, A., DEPIREUX, J. und DUCHESNE, J.

Origin of radio-resistance of paired substituted bases: 9-ethyl-guanine and 1-methyl-cytosine.

Nature 206, 925-6 (1965)

DORLET, C., VAN DE VORST, A. und BERTINCHAMPS, A.J.

Electron spin resonance in  $\gamma$ -irradiated deoxyribonucleic acid.

Nature 194, 767 (1962)

GERDIL, R.

The crystal structure of thymine monohydrate.

Acta Cryst. 14, 333-44 (1961)

GEUSIC, J.E. und BROWN, L.C.

Computation of the principal components of an asymmetric g-tensor from paramagnetic resonance data.

Phys. Rev. 112, 64-5 (1958)

HART, E.J. und PLATZMAN, R.L.

Radiation Chemistry.

In: Mechanisms in Radiobiology. I. General Principles.

Herausgeber: M. Errera und A. Forssberg, Academic Press, New York und London (1961)

HELLER, C.

Electron spin resonance and internal rotation of the methyl group in the  $\text{CH}_3\dot{\text{C}}(\text{COOH})_2$ -radical.

J. Chem. Phys. 36, 175-81 (1962)

HERAK, J.N. und GORDY, W.

Free radicals formed by hydrogen atom bombardment of the nucleic-acid bases.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington) 54, 1287-92 (1965)

HORSFIELD, A., MORTON, J.R., ROWLANDS, J.R. und WHIFFEN, D.H.

The electron spin resonance spectra of  $\text{CH}(\text{SO}_3^-)_2$  and  $\text{N}(\text{SO}_3^-)_2$ .

Mol. Phys. 5, 241-50 (1962)

HORSFIELD, A., MORTON, J.R. und WHIFFEN, D.H.

Electron spin resonance of  $\gamma$ -irradiated malonic acid.

Mol. Phys. 4, 327-32 (1961)

HYDE, J.S.

Signal amplitudes in electron paramagnetic resonance.

Varian/Technical Information, S. 10-14 (1965)

HYDE, J.S. und FREEMAN, E.S.

EPR observations of  $\text{NH}_3^+$  formed by X-ray irradiation of ammonium perchlorate crystals.

J. Phys. Chem. 65, 1636-8 (1961)

HYDE, J.S., RANON, U. und LANDGRAF, W.

EPR at 35 GHz

Varian/Technical Information, S. 1-6 (1965/66)

INGRAM, D.J.E.

Free radicals as studied by electron spin resonance.

Butterworth, London (1958)

JACOBS, S.S.

The solid state gamma irradiation of crystalline amino acids and sugars.

Dissertation / University of Colorado (1962)

JEFFREY, G.A. und KINOSHITA, Y.

The crystal structure of cytosine monohydrate.

Acta Cryst. 16, 20-8 (1963)

KECK, K., HAGEN, U. und FRIEBOLIN, H.

Bildung eines Cyclonucleotids bei Röntgenbestrahlung von Adenosin-monophosphat.

Die Naturwissenschaften 53, 304-5 (1966)

KÖHNLEIN, W.

Elektron-Spin-Resonanzen in bestrahlten Bakteriophagen und deren Bestandteilen. II. Mitteilung.

Strahlentherapie 122, 437-48 (1963)

MANTIONE, M.J. und PULLMAN, B.

Sur le mécanisme de la photodimerisation de la thymine.

Biochim. Biophys. Acta 91, 387-98 (1964)

McCONNELL, H.M. und CHESNUT, D.B.

Theory of isotropic hyperfine interactions in  $\pi$ -electron radicals.

J. Chem. Phys. 28, 107-17 (1958)

McCONNELL, H.M., HELLER, C., COLE, T. und FESSENDEN, R.W.

Radiation damage in organic crystals. I.  $\text{CH}(\text{COOH})_2$  in malonic acid.

J. Am. Chem. Soc. 82, 766-75 (1960)

MORTON, J.R.

A paramagnetic species in irradiated  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ .  
J. Phys. Chem. Solids, 24, 209-12 (1963)

MORTON, J.R.

Electron spin resonance spectra of oriented radicals.  
Chem. Rev. 64, 453-71 (1964)

MÜLLER, A.

Spektrographische Untersuchungen mittels paramagnetischer  
Elektronenresonanz über die Wirkung ionisierender Strah-  
len auf elementare biologische Objekte.  
Habilitationsschrift/Verlag der Akademie der Wissen-  
schaften und der Literatur in Mainz (1964)

MÜLLER, A.

Zum Mechanismus der Strahlenschädigung von DNS.  
Vortrag zur Tagung der Deutschen Gesellschaft für  
Biophysik, Hannover, (1966)

ORMEROD, M.G.

Free-radical formation in irradiated deoxyribonucleic acid.  
Intern. J. Rad. Biol. 9, 291-300 (1965)

PLATZMAN, R.L.

The physical and chemical basis of mechanisms in radiation  
biology.

In: Radiation Biology and Medicine, S. 15-72.

Herausgeber: W.D. Claus/Addison-Wesley, Reading, Mass.  
(1958)

PRUDEN, B.L.

Electron spin resonance studies of irradiated nucleic  
acids and constituents of nucleic acids.

Dissertation / Duke University (1965)

PRUDEN, B.L., SNIPES, W. und GORDY, W.

Electron spin resonance of an irradiated single crystal  
of thymidine.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington) 53, 917-24 (1965)

PULLMAN, B. und MANTIONE, M.J.

Sur les densités de spin dans les radicaux libres provenant de bases puriques et pyrimidiques par fixation d'un atome d'hydrogène.

Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 260, 5643-5 (1965)

REUSCHL, H.

Persönliche Mitteilung (1965)

ROSE, H.A.

Cytosine hydrate (4-amino-2-hydroxypyrimidine hydrate)

Analyt. Chem. 27, 158-9 (1955)

ROWLANDS, J.R.

The electron spin resonance spectrum of  $\text{NH}(\text{SO}_3^-)$  in  $\gamma$ -irradiated potassium sulphamate.

Mol. Phys. 5, 565-71 (1962)

SALOVEY, R., SHULMAN, R.G. und WALSH, W.M. jr.

Electron spin resonance of irradiated DNA.

J. Chem. Phys. 30, 839-40 (1963)

SCHNEIDER, W.

Persönliche Mitteilung (1966)

SINGH, B.B. und CHARLESBY, A.

Sequence of events in the process of radiation damage in a nucleic acid constituent.

Intern. J. Rad. Biol. 9, 157-64 (1965)

TENCH, A.J.

Electron spin resonance in an irradiated single crystal of tetramethyl ammonium chloride.

J. Chem. Phys. 38, 593-6 (1963)

WATSON, D.G., SUTOR, D.J. und TOLLIN, P.

The crystal structure of deoxyadenosine monohydrate.

Acta Cryst. 19, 111-24 (1965)

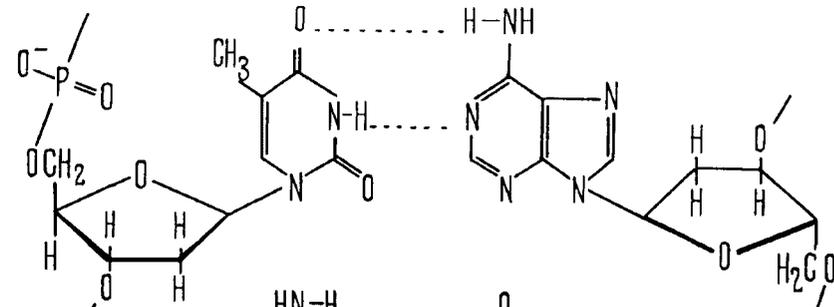
WHIFFEN, D.H.

Persönliche Mitteilung (1966). Im Druck.

X. Abbildungen

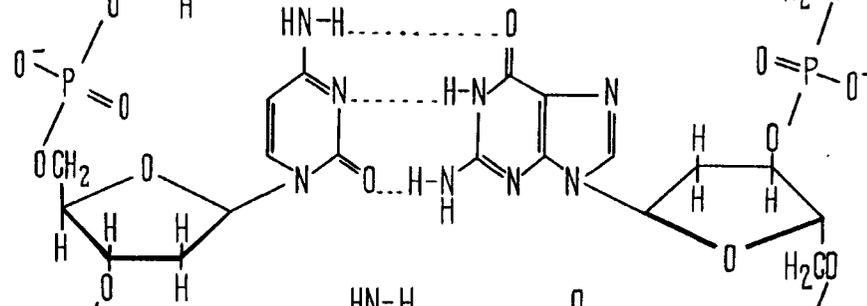
Abb. 1: Ausschnitt aus der DNS-Struktur.

Thymidin-  
monophosphat



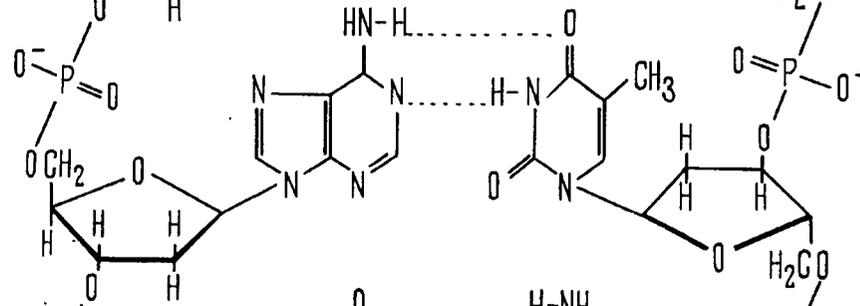
Desoxyadenosin-  
monophosphat

Desoxycytidin-  
monophosphat



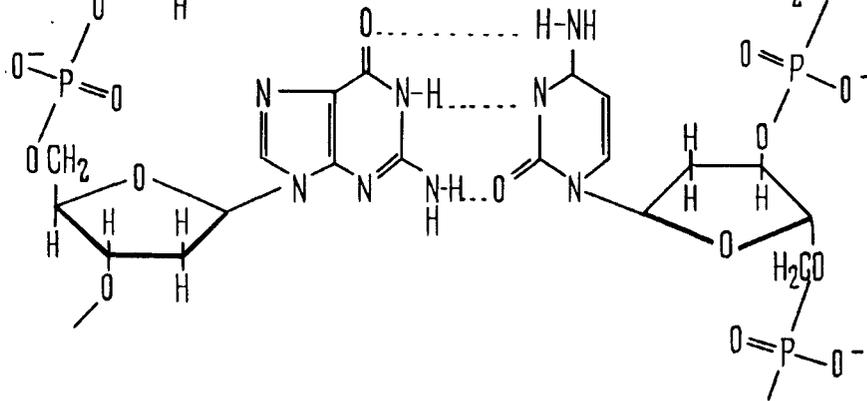
Desoxyguanosin-  
monophosphat

Desoxyadenosin-  
monophosphat



Thymidin-  
monophosphat

Desoxyguanosin-  
monophosphat



Desoxycytidin-  
monophosphat

Abb. 2: Strukturformel des Thymidins.

Abb. 3: Strukturformel des 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikals.  
R' = Zuckerrest.

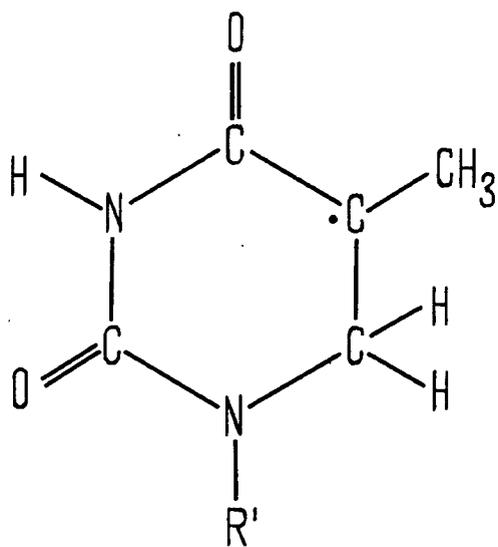
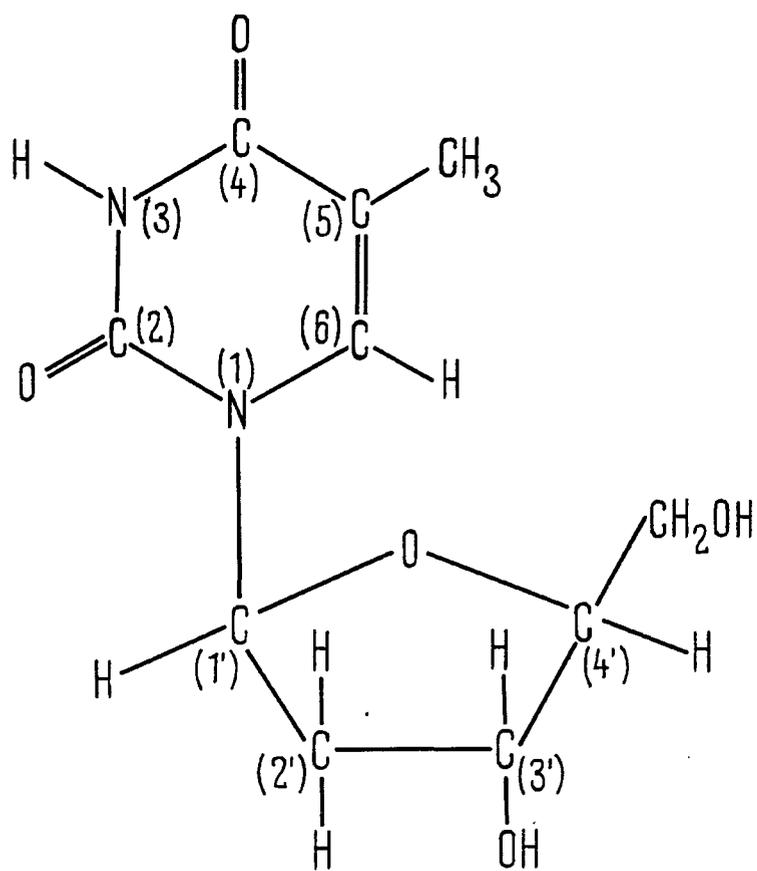
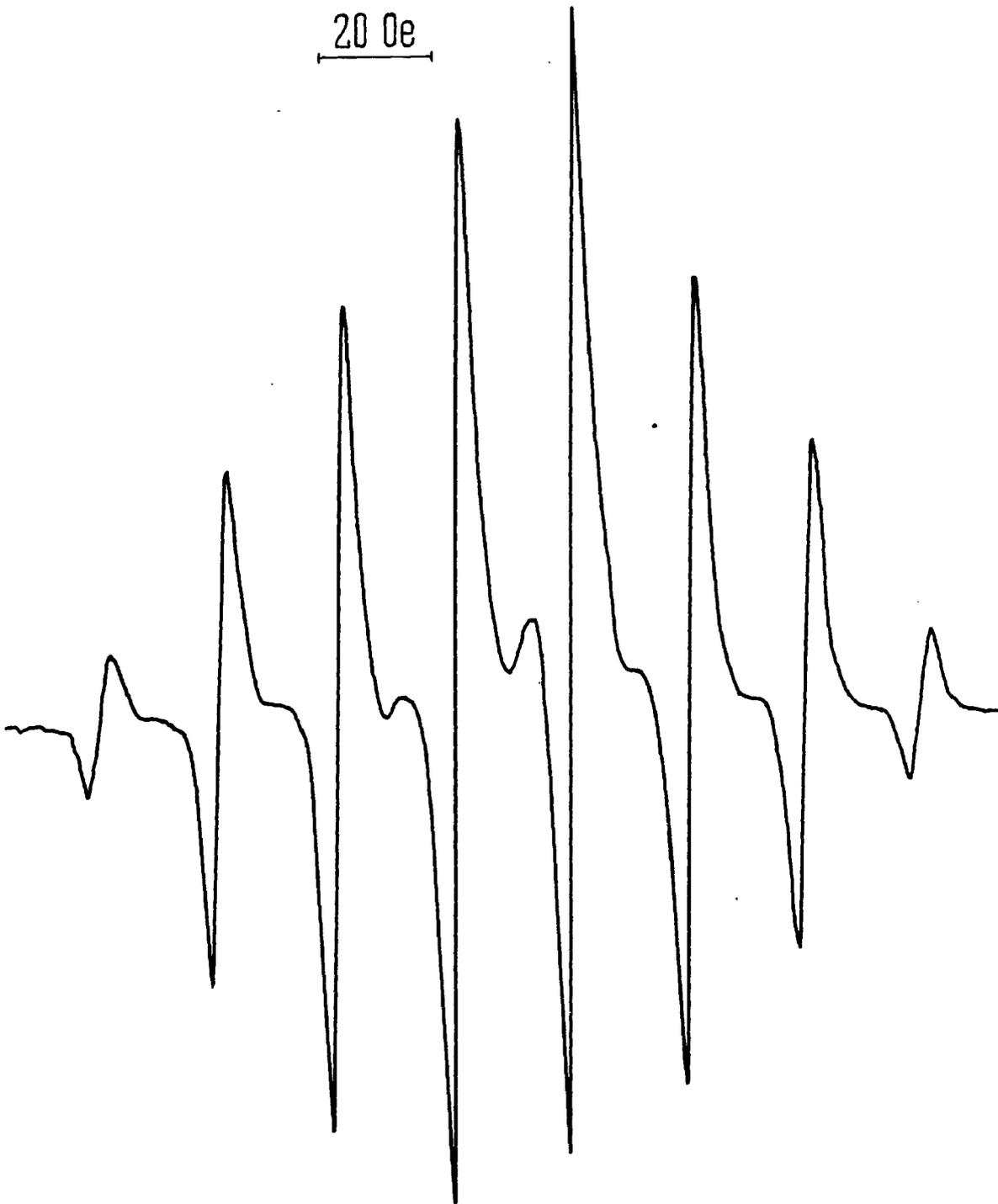


Abb. 4: ESR-Spektrum des 5,6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikals  
im Einkristall von Thymidin.  
Magnetfeld parallel zur  $b'$ -Achse.

20 0e



$H_0$  →

Abb. 5: Strukturformel des Dihydrothymins.

Abb. 6: Strukturformel des 4-Hydroxy-Dihydrothymyl-(4)-  
Radikals.

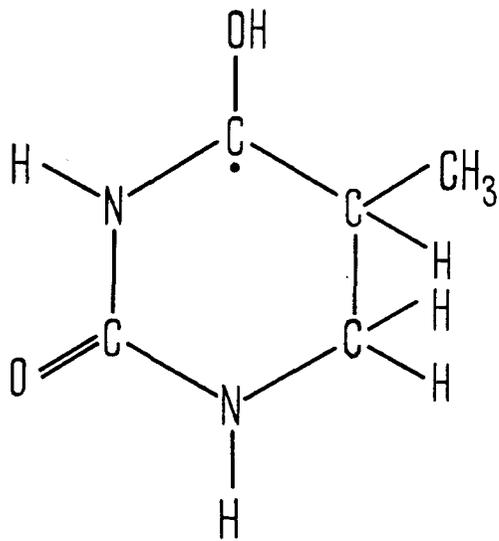
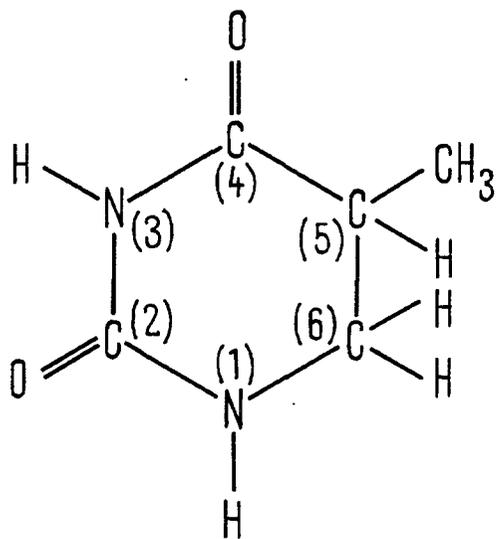


Abb. 7: ESR-Spektrum von bestrahltem Dihydrothymin-Pulver.

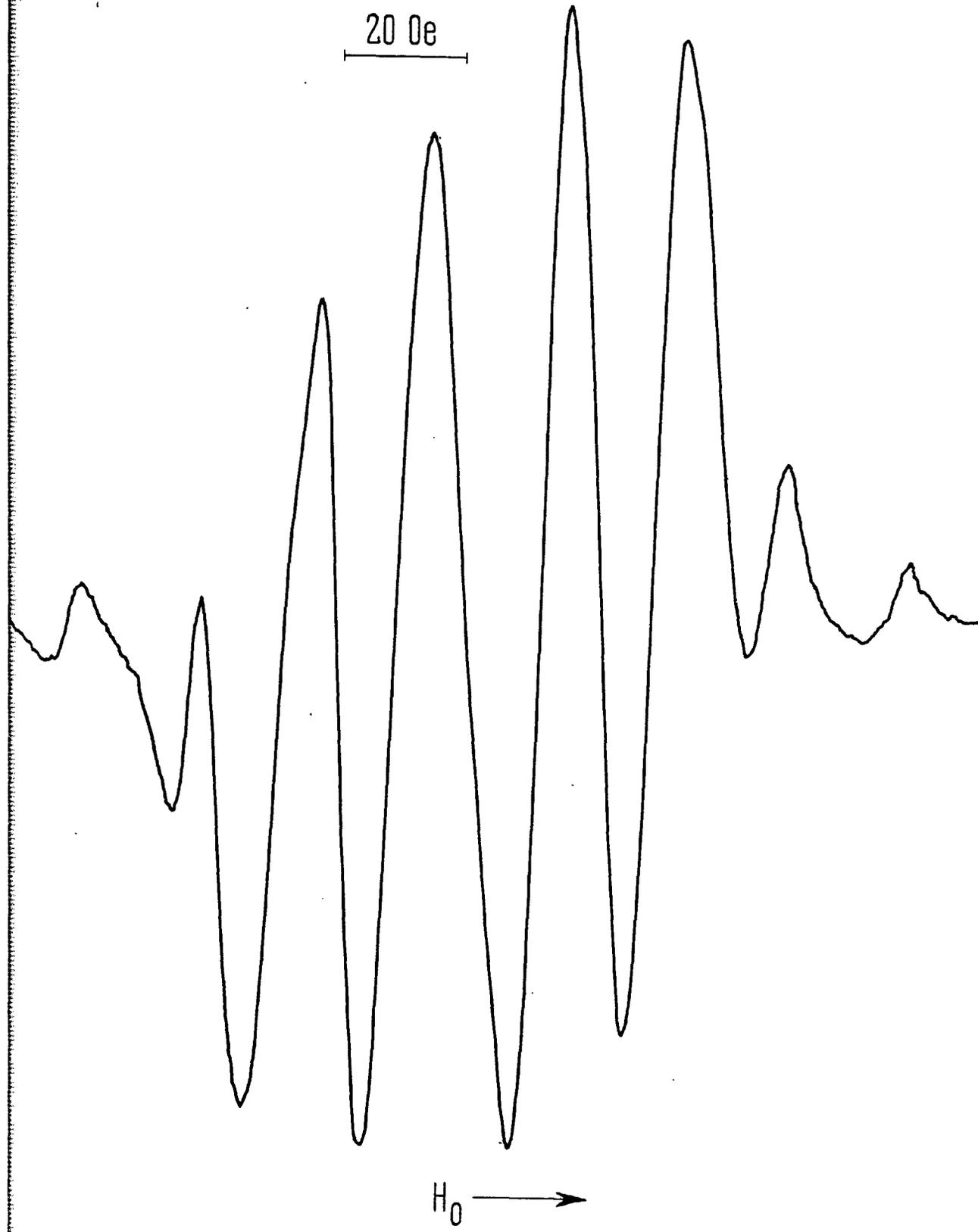
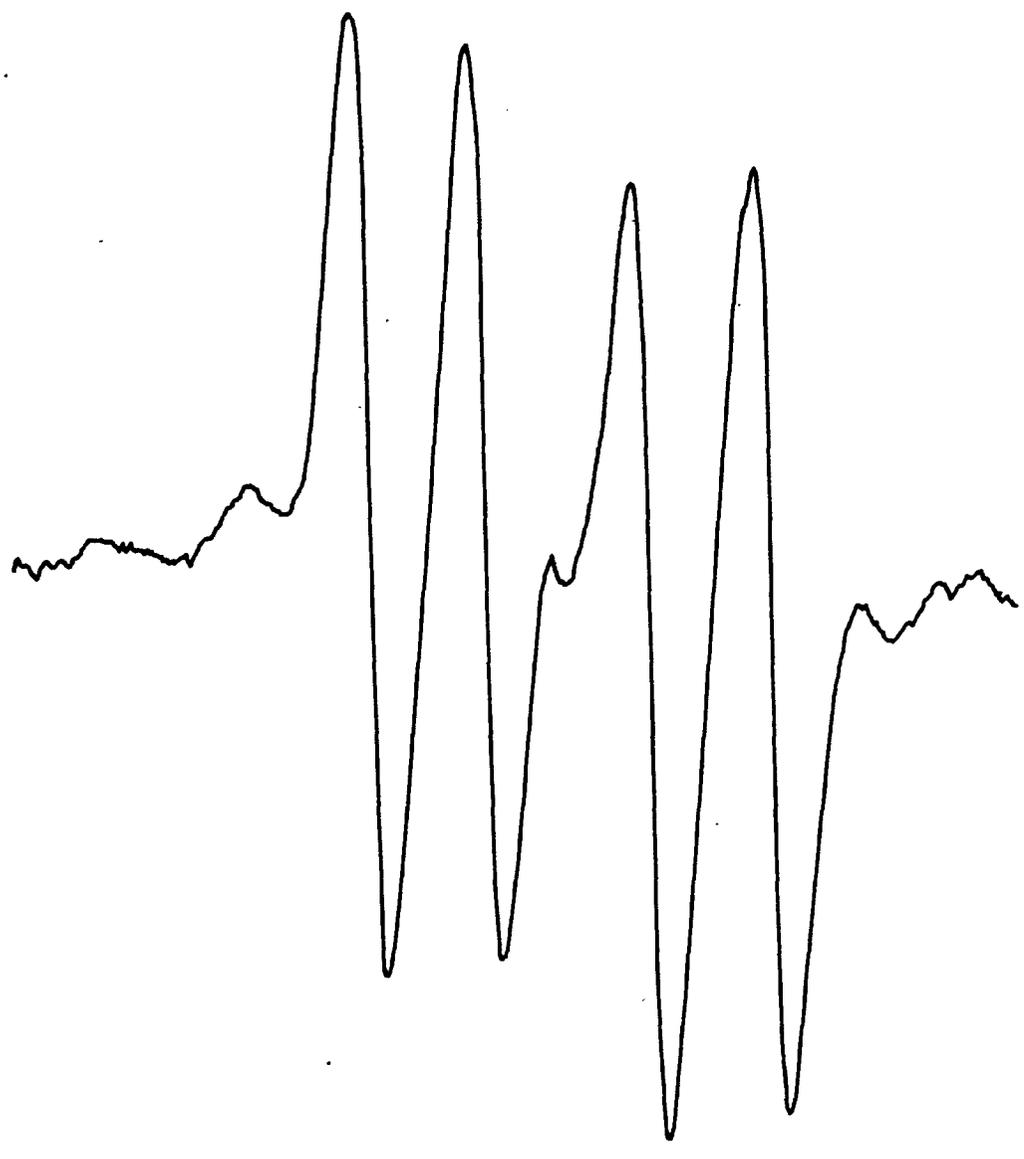


Abb. 8: ESR-Spektrum des 4-Hydroxy-Dihydrothymyl-(4)-  
Radikals im Einkristall von Dihydrothymin.  
Magnetfeld parallel zur y-Achse.

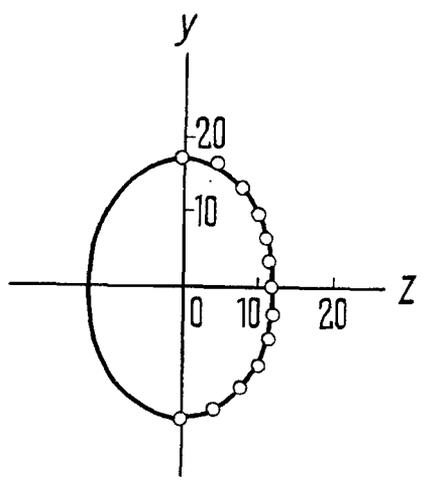
20 Oe



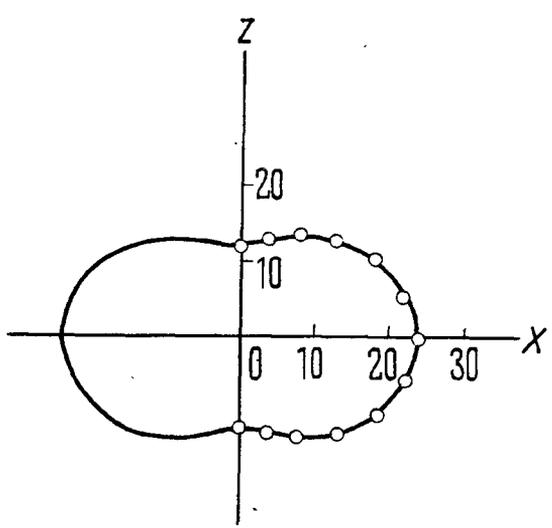
$H_0$  →

Abb. 9: Polardiagramme der sekundären Aufspaltung ( $O_e$ )  
im ESR-Spektrum des 4-Hydroxy-Dihydrothymyl-(4)-  
Radikals beim Einkristall von Dihydrothymin.

a)



b)



c)

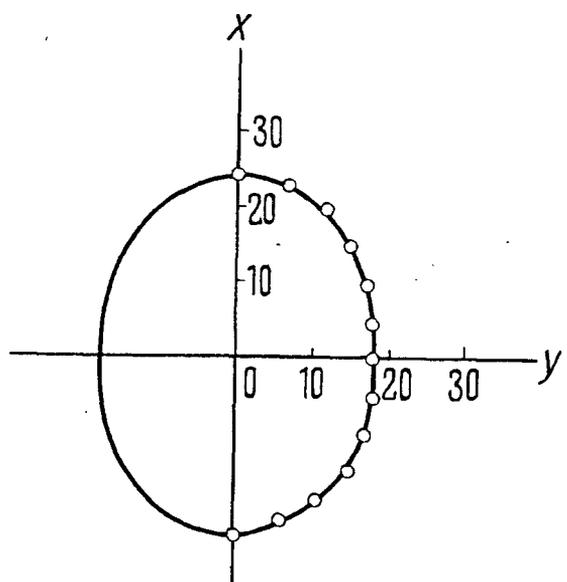
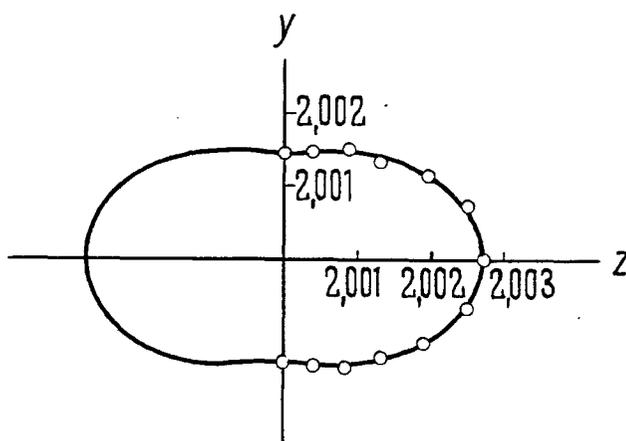
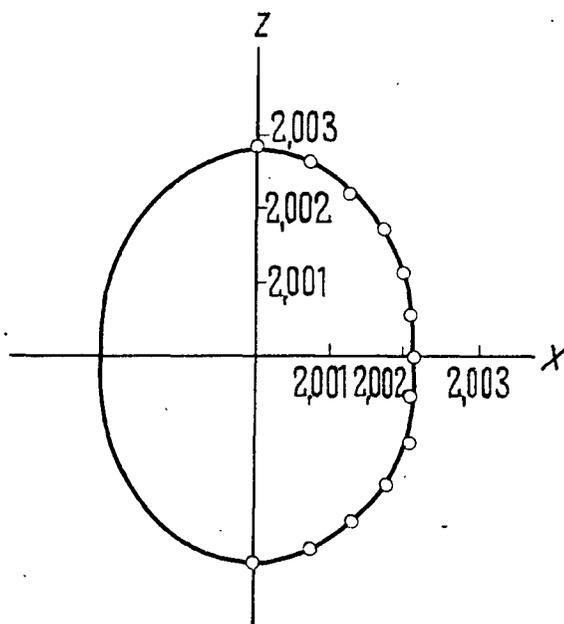


Abb. 10: g-Faktor-Polardiagramme des 4-Hydroxy-Dihydrothymyl-(4)-Radikals im Einkristall von Dihydrothymin.

a)



b)



c)

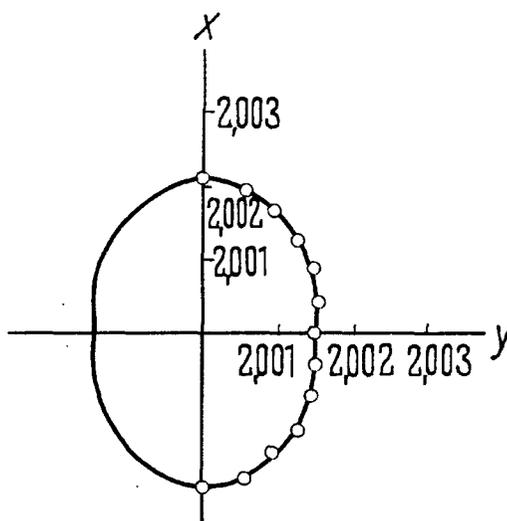


Abb. 11: Strukturformel des Cytosins.

Abb. 12: Strukturformel des 2-Hydroxy-Cytosyl-(2)-Radikals.

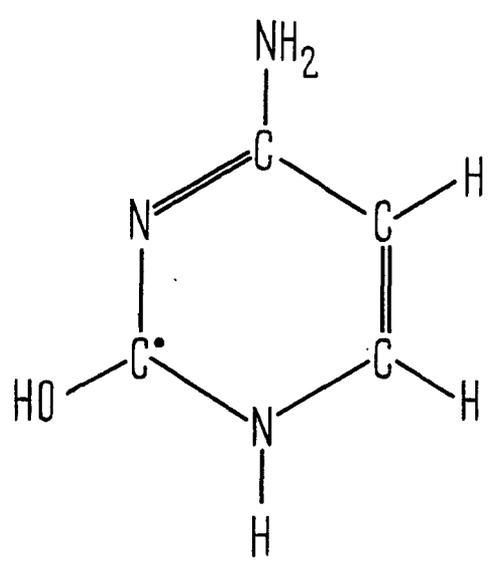
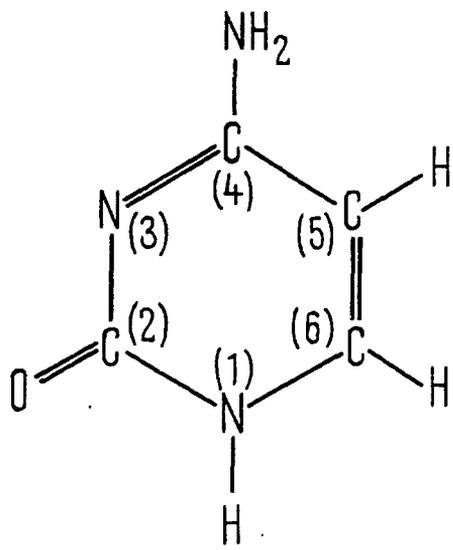


Abb. 13: ESR-Achsen beim Einkristall von Cytosin-Monohydrat.

Abb. 14: Prinzip der Molekülbänder im Einkristall von  
Cytosin Monohydrat.  
Gestrichelte Linien: Wasserstoff-Brückenbindungen.

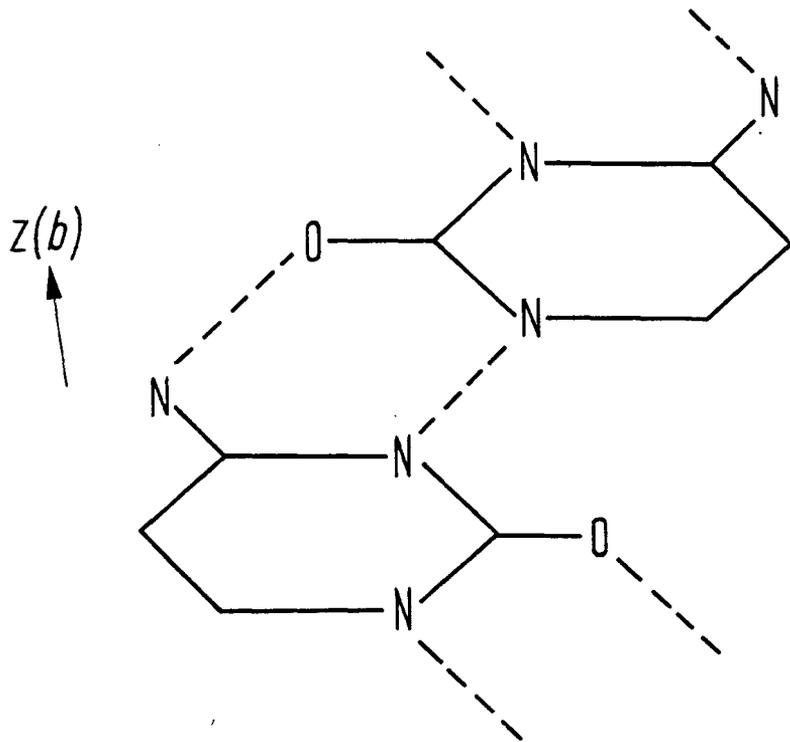
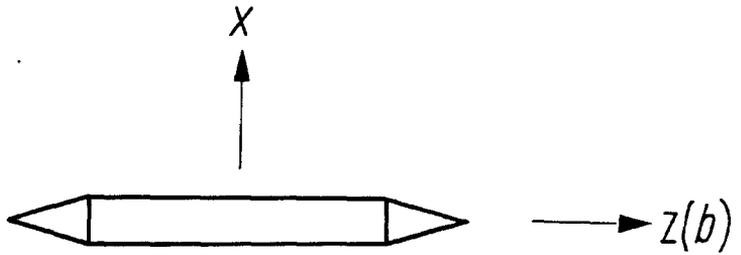
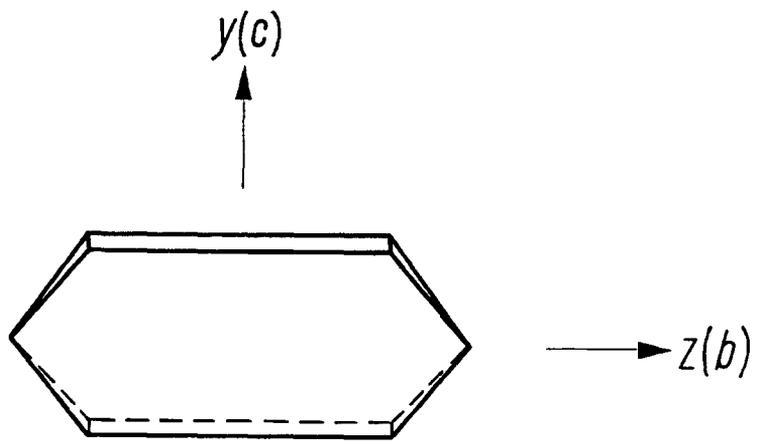
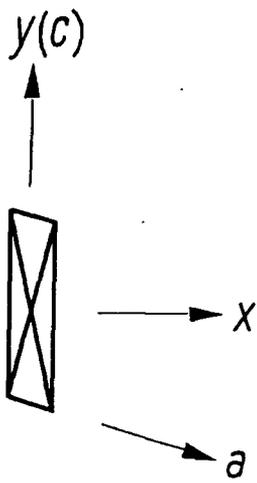
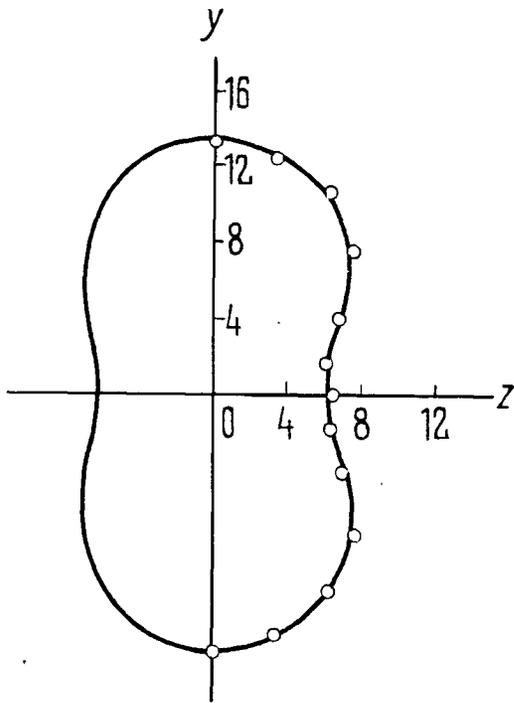
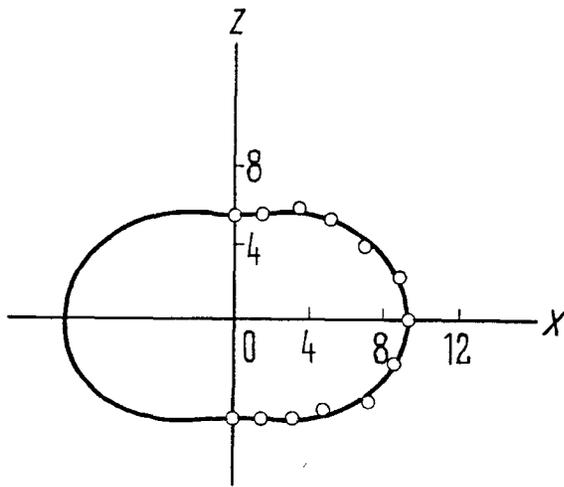


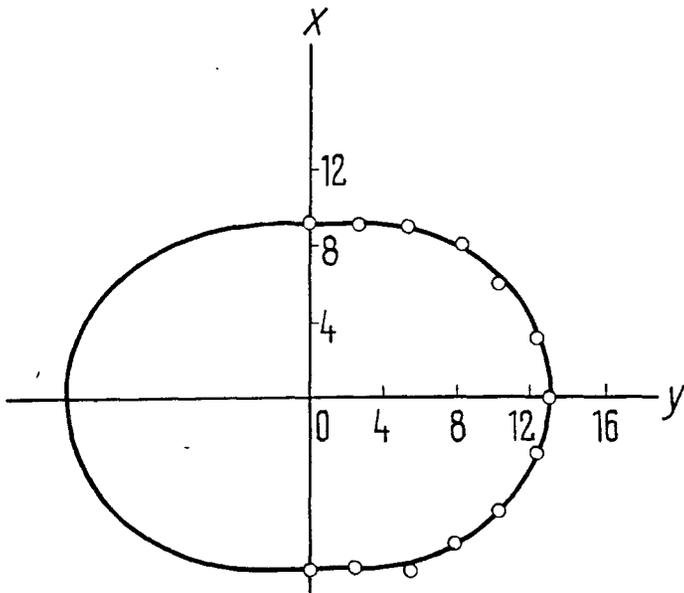
Abb. 15: Polardiagramme des Kopplungsfaktors (Oe) im ESR-Dublett des 2-Hydroxy-Cytosyl-(2)-Radikals beim Einkristall von Cytosin Monohydrat.



a)



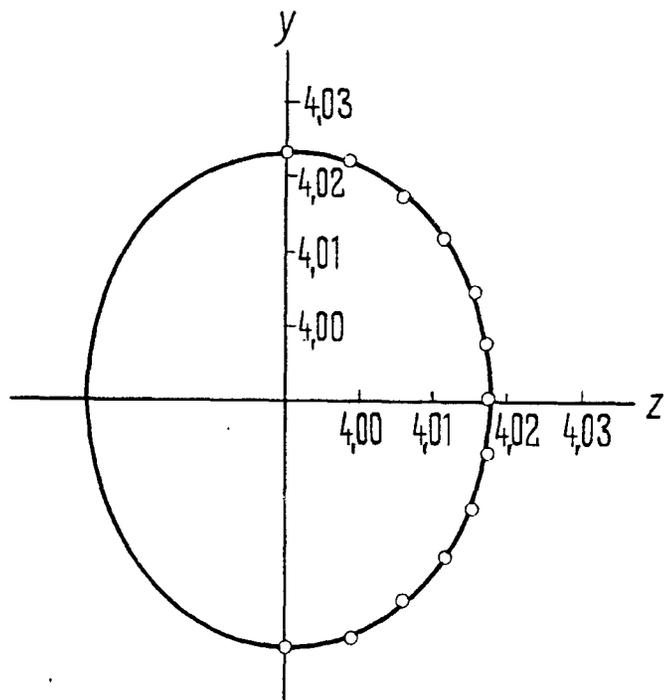
b)



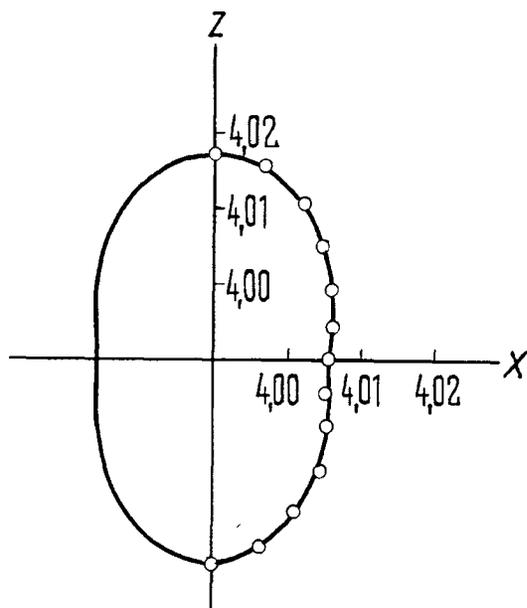
c)

Abb. 16: Polardiagramme von  $g^2$  des 2-Hydroxy-Cytosyl-(2)-  
Radikals im Einkristall von Cytosin Monohydrat.

a)



b)



c)

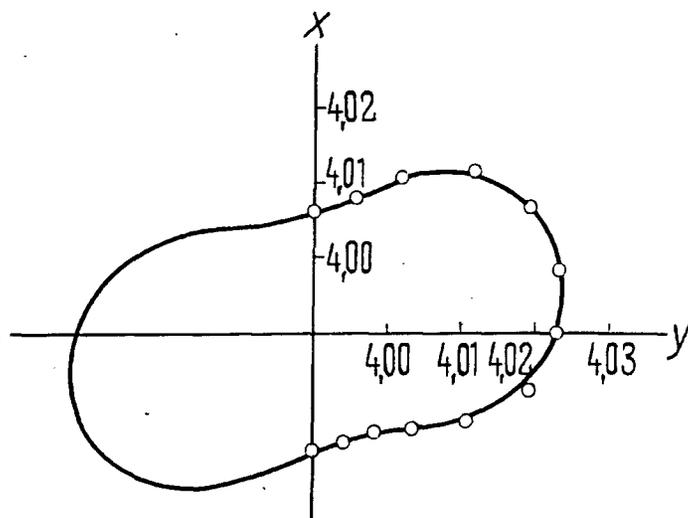
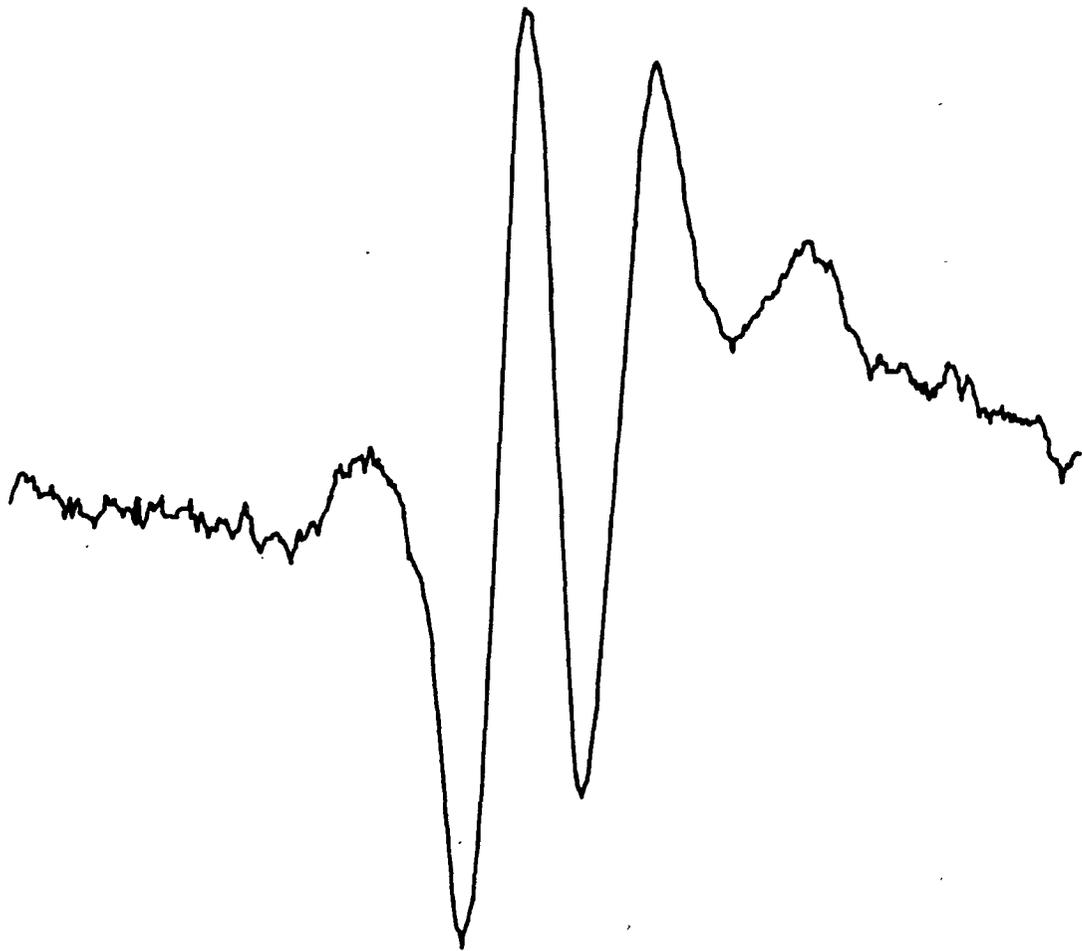


Abb. 17: ESR-Spektrum des 2-Hydroxy-Cytosyl-(2)-Radikals  
im Einkristall von Cytosin Monohydrat.  
Magnetfeld parallel zur y-Achse.

20 0e

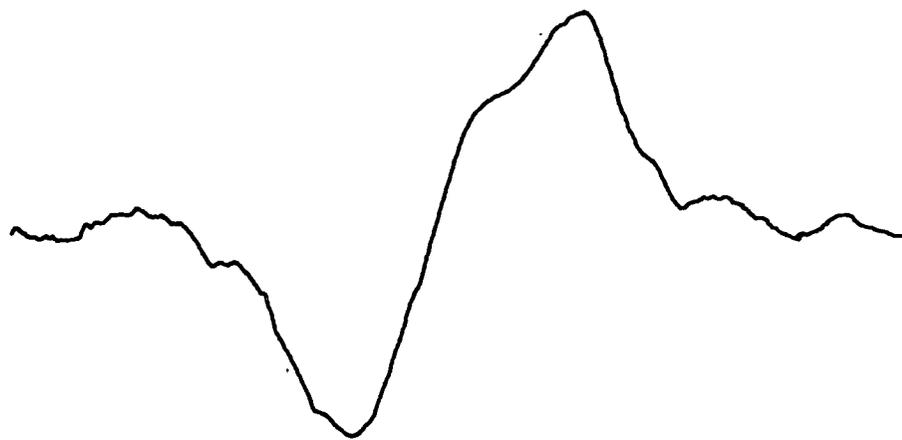


H<sub>0</sub> →

Abb. 18: ESR-Spektrum von bestrahltem Cytosin-Pulver.

Abb. 19: ESR-Spektrum von bestrahltem Cytosin-Pulver,  
das zuvor mit  $D_2O$  behandelt wurde.

20 Oe



$H_0$  →

Abb. 20: Strukturformel des Adenosin Hydrochlorides.

Abb. 21: Strukturformel des 7,8-Dihydro-Adenyl-(7)-  
Radikals.

R' = Zuckerrest.

(Spindichten nach PULLMAN und MANTIONE 1965)

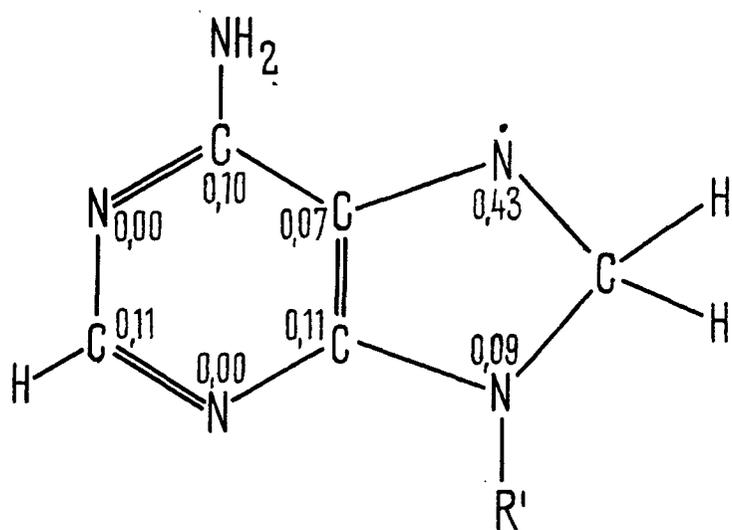
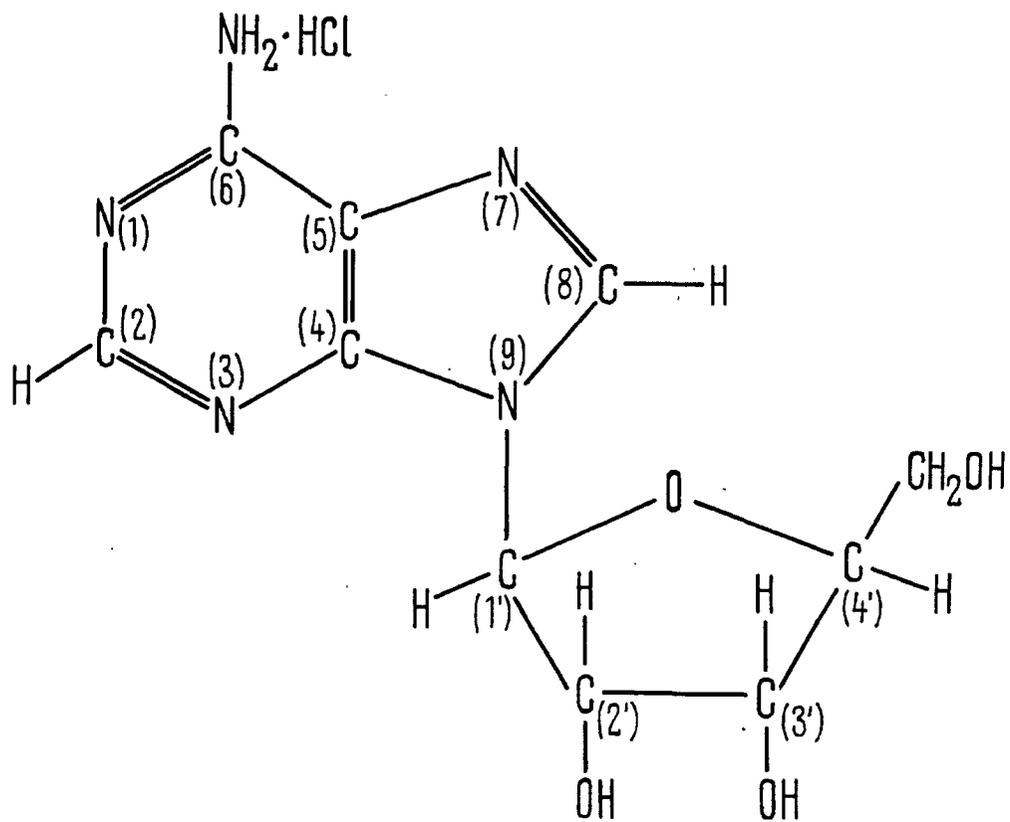


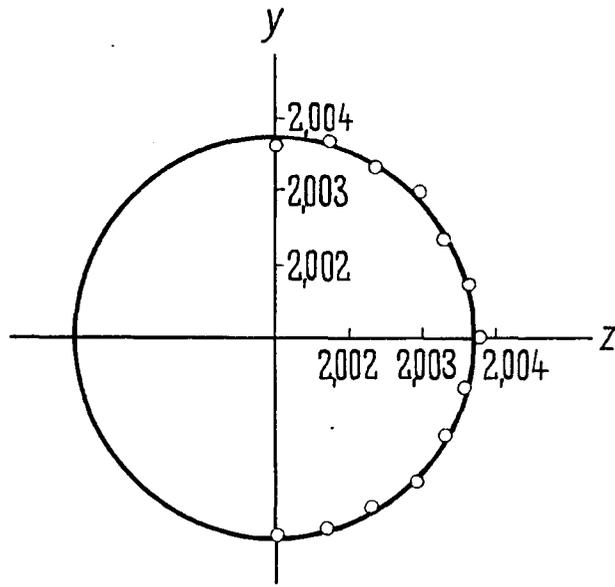
Abb. 22: ESR-Spektrum des 7,8-Dihydro-Adenyl-(7)-Radikals  
im Einkristall von Adenosin Hydrochlorid.  
Magnetfeld parallel zur x-Achse.

20 Oe

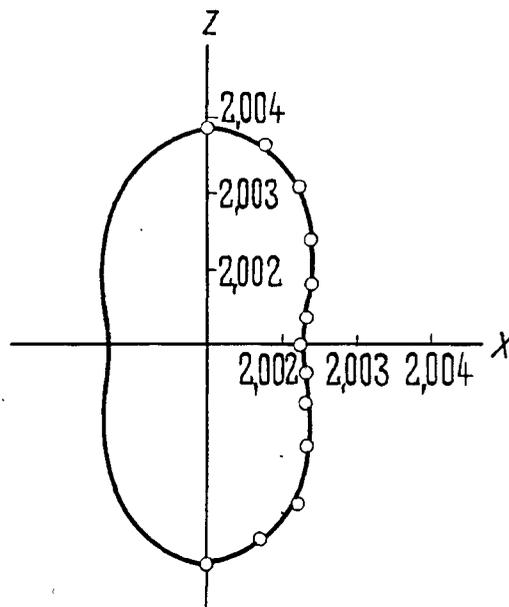


Abb. 23: g-Faktor-Polardiagramme des 7,8-Dihydro-  
Adenyl-(7)-Radikals im Einkristall von  
Adenosin Hydrochlorid.

a)



b)



c)

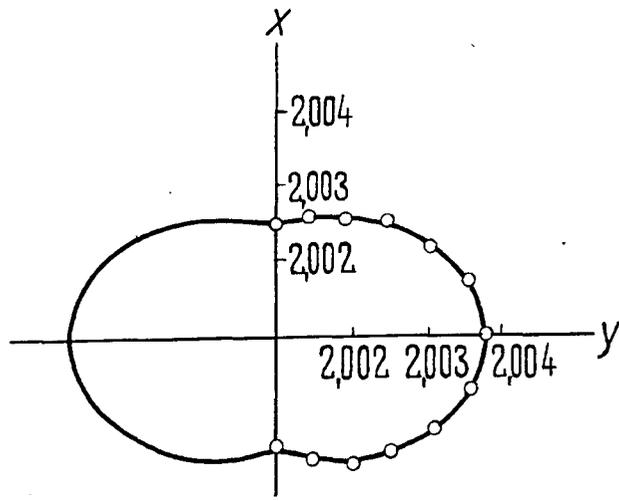


Abb. 24: ESR-Achsen beim Einkristall von Adenosin Hydrochlorid.

Abb. 25: Anordnungsprinzip der Radikale im Kristallgitter von Adenosin Hydrochlorid.

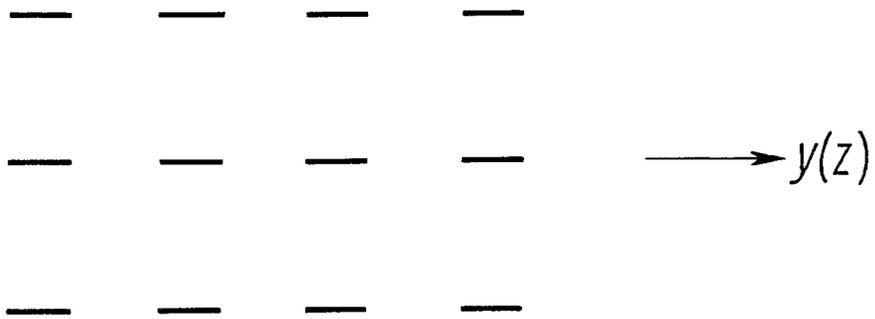
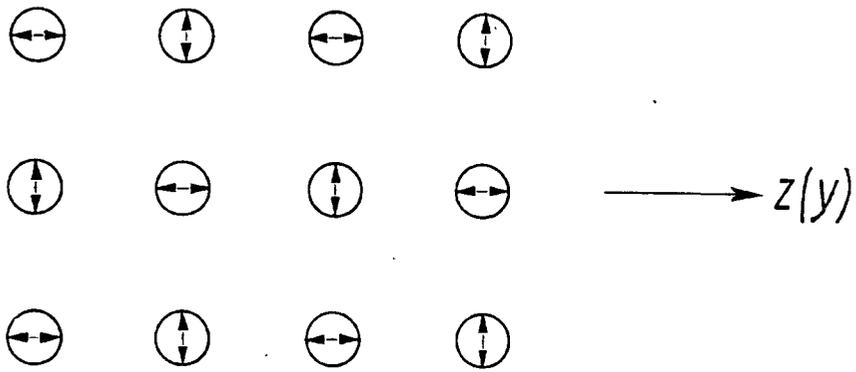
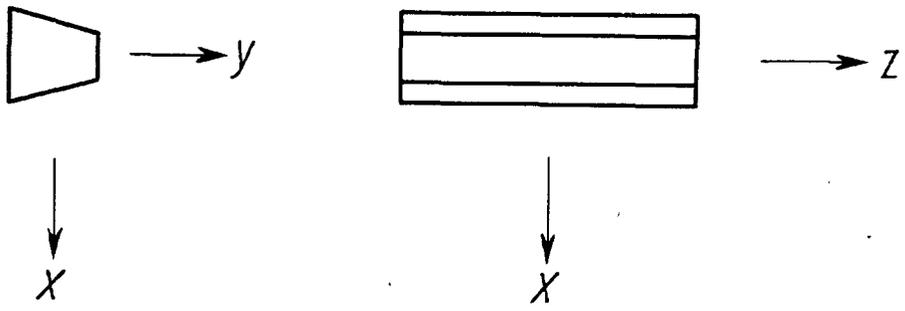


Abb. 26: Strukturformel des Desoxyadenosins.

Abb. 27: Struktur des vermuteten Singulett-Radikals  
der Purin-Basen.

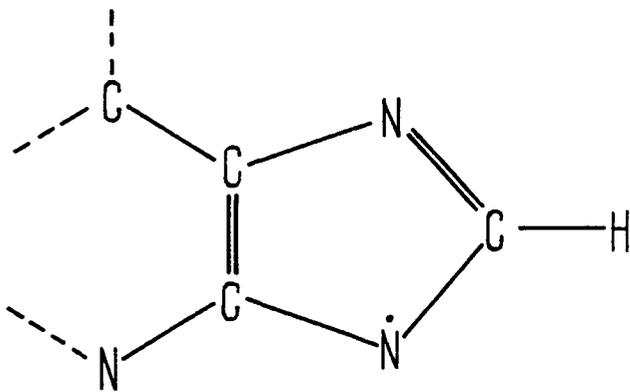
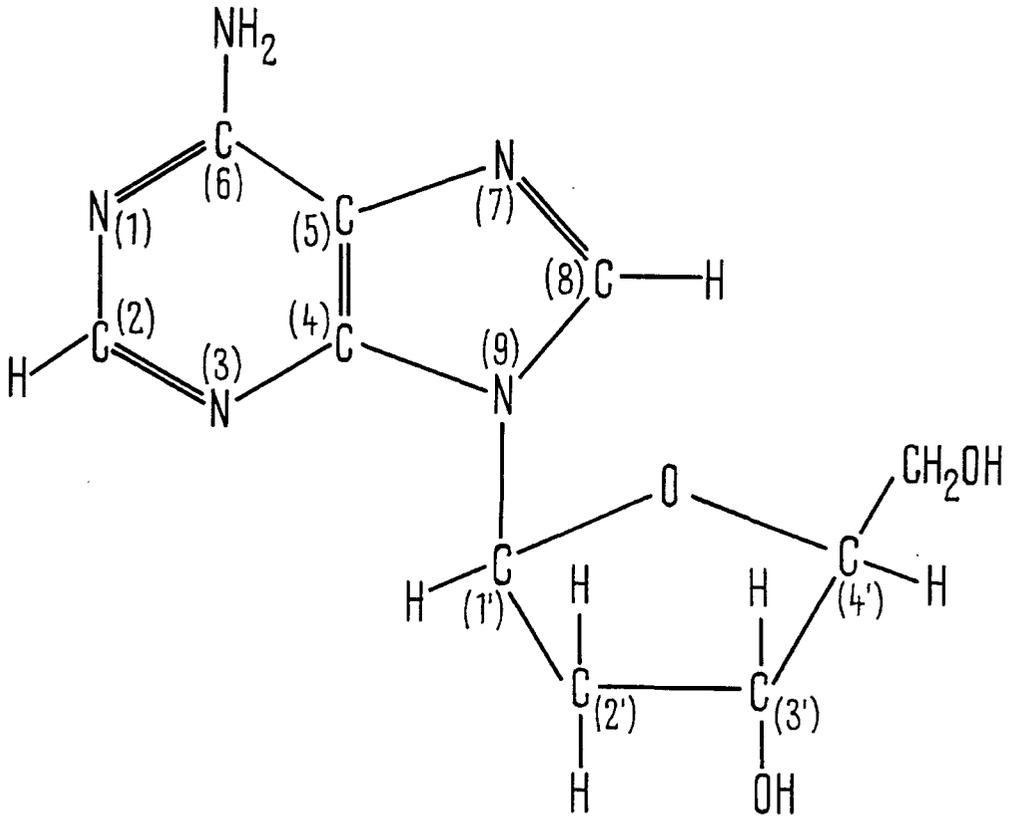
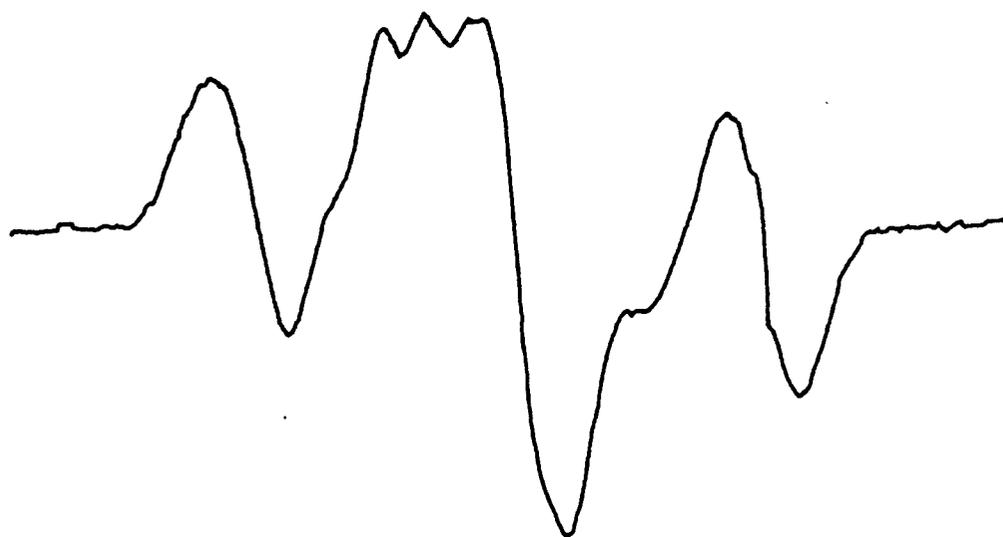


Abb. 28: ESR-Spektrum des 7,8-Dihydro-Adenyl-(7)-Radikals  
im Einkristall von Desoxyadenosin Monohydrat.  
Magnetfeld parallel zur z-Achse.

20 Oe



$H_0$  →

Abb. 29: Strukturformel des Desoxyguanosin Hydrochlorids.

Abb. 30: Strukturformel des 7,8-Dihydro-Guanyl-(7)-  
Radikals.  
R' = Zuckerrest.  
(Spindichten nach PULLMAN und MANTIONE 1965).

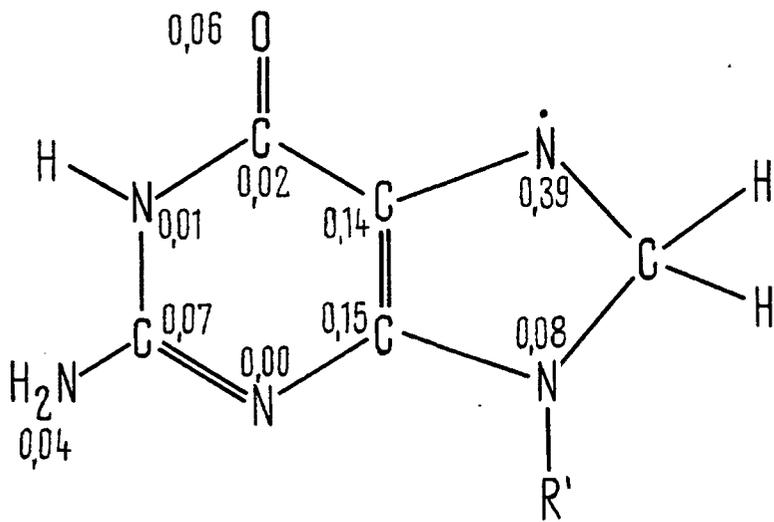
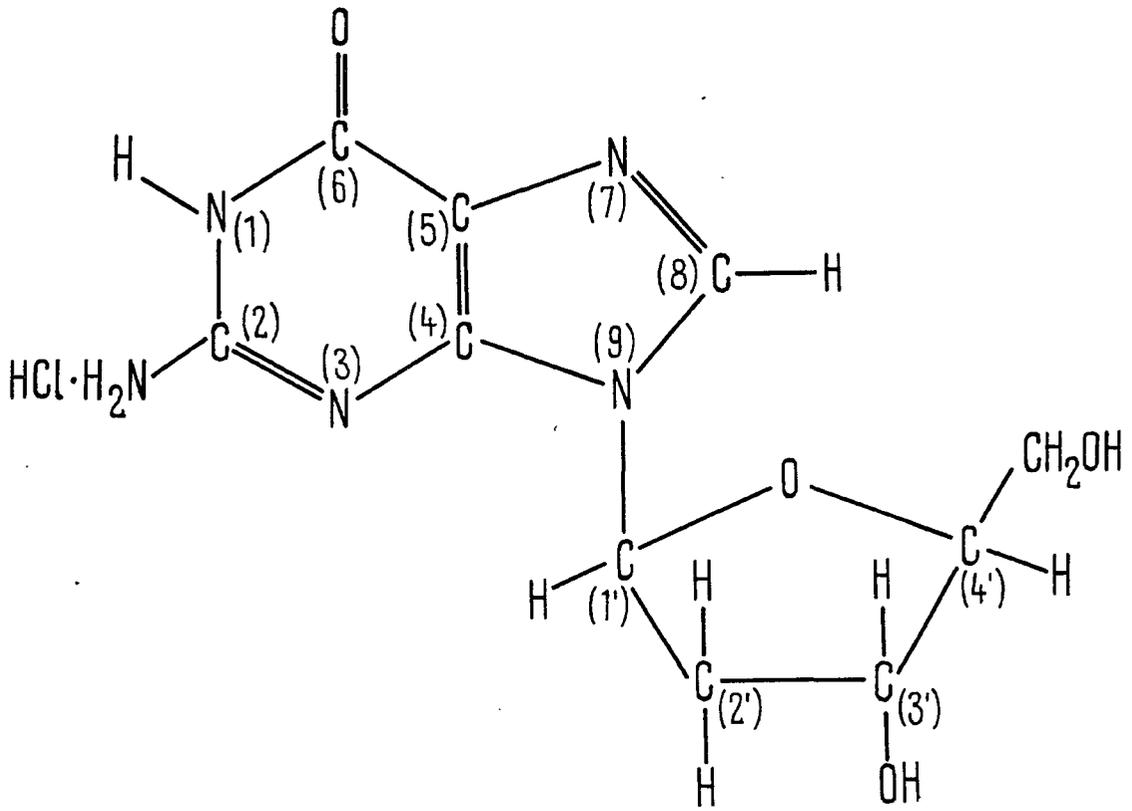
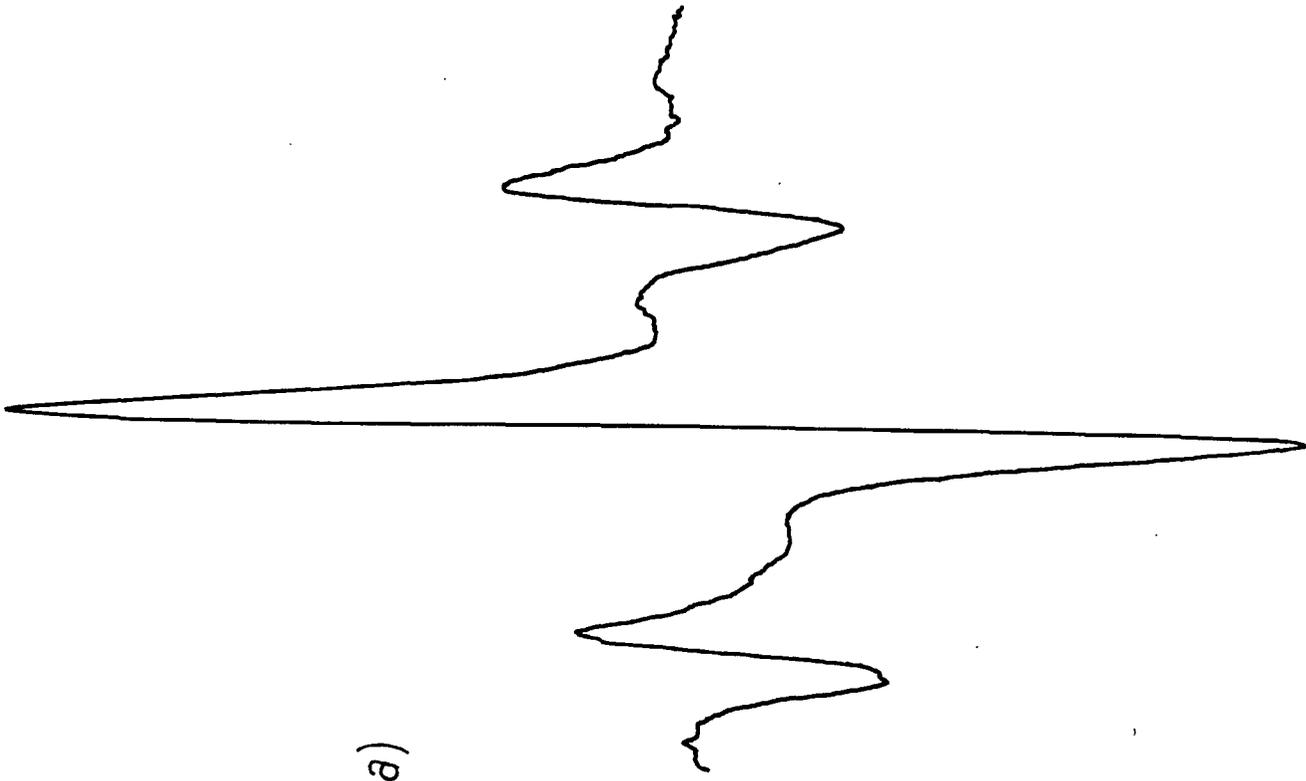


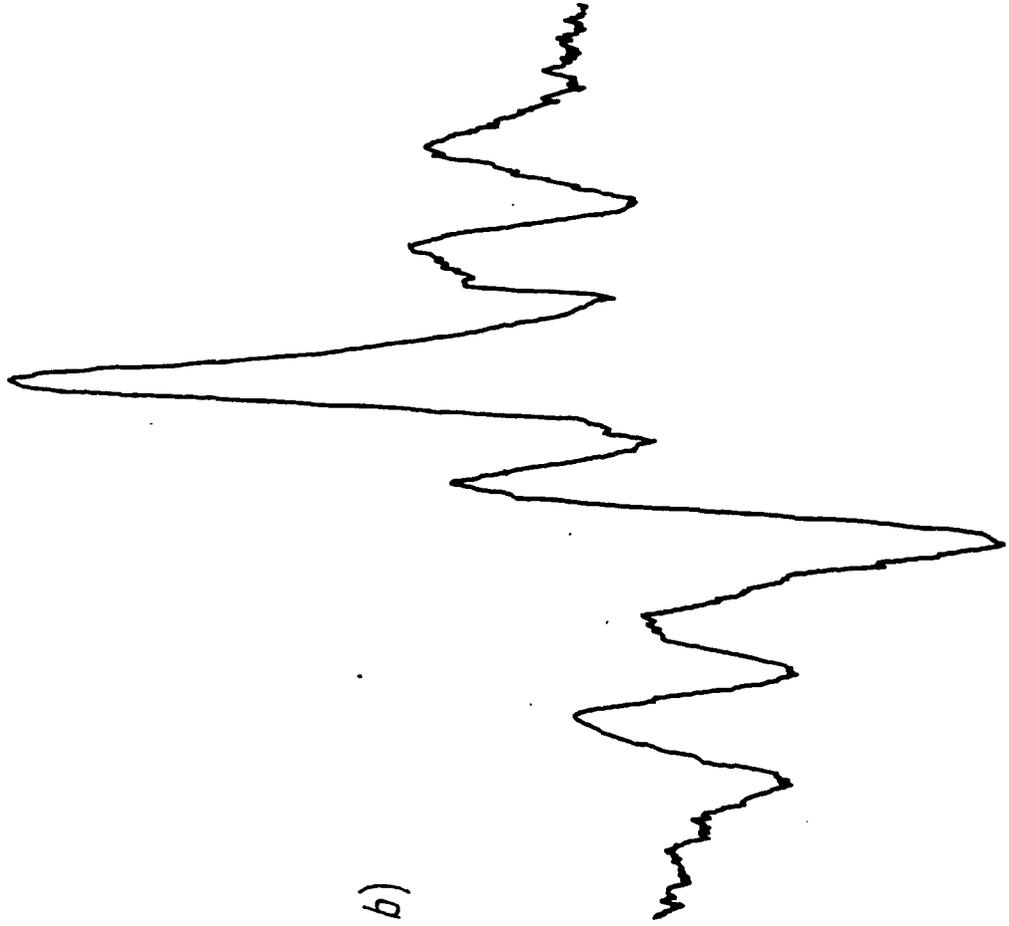
Abb. 31: ESR-Spektren des 7,8-Dihydro-Guanyl-(7)-Radikals  
im Einkristall von Desoxyguanosin Hydrochlorid.

- a) Magnetisch äquivalente Positionen.
- b) Zwei magnetisch unterscheidbare Positionen.

20 0e



a)



b)

$H_0$  

Abb. 32: Die Bindungswinkel (in  $^{\circ}$ ) der Base im Desoxy-  
adenosin Monohydrat  
(nach WATSON, SUTOR und TOLLIN 1965).

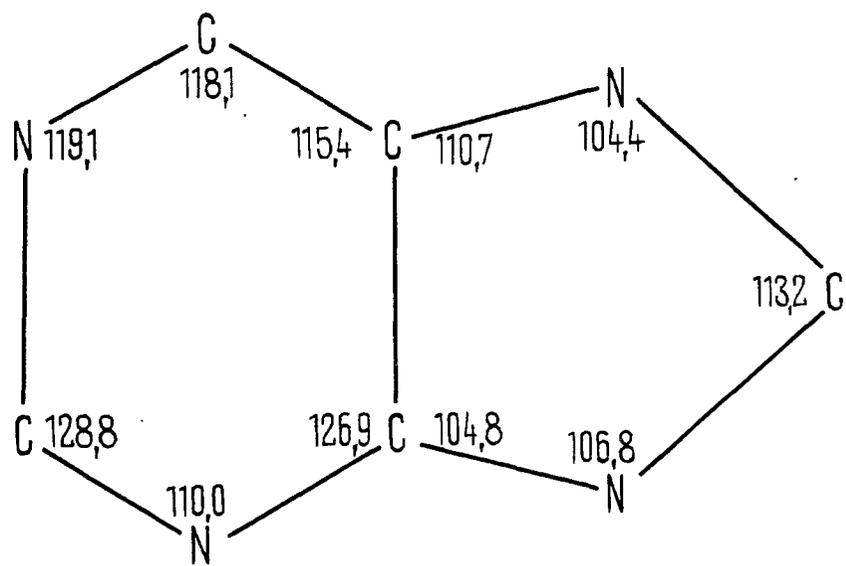


Abb. 33: Spindichten für die einfach geladenen Adenin-  
bzw. Guanin-Moleküle nach BAUDET, BERTHIER und  
PULLMAN (1962).

- a) Adenin<sup>+</sup> (obere Zahlen) und Adenin<sup>-</sup> (untere Zahlen)
- b) Guanin<sup>+</sup> (obere Zahlen) und Guanin<sup>-</sup> (untere Zahlen)

