

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

Dezember 1967

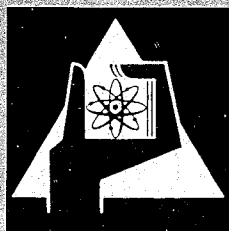
KFK 727

Institut für Strahlenbiologie

Freie Radikale in bestrahlten Einkristallen von Purin-Nucleosiden:
Adenosin, Desoxyadenosin und Desoxyguanosin

Der Ursprung des ESR-Dubletts in der Nucleinsäurebase Cytosin:
eine Einkristallstudie bei 8 mm Wellenlänge

H. Dertinger



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE

Freie Radikale in bestrahlten Einkristallen von Purin-Nucleosiden: Adenosin, Desoxyadenosin und Desoxyguanosin

HERMANN DERTINGER

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforsch. 22 b, 1261—1266 [1967]; eingegangen am 5. April 1967)

ESR-studies on irradiated single crystals of adenosine hydrochloride, deoxyadenosine monohydrate and deoxyguanosine hydrochloride demonstrate clearly the formation of 7,8-dihydro-adenyl(guanyl)-(7)-radicals to be a major consequence of irradiation. This species shows a characteristic triplet spectrum and is formed by addition of one atom of hydrogen at the position C(8) of the purine base.

Das Auftreten freier Radikale in bestrahltem organischem Material bildet eine wichtige Zwischenstufe in der Reaktionsfolge, die mit der Absorption von Strahlenenergie ihren Anfang nimmt und im allgemeinen zu einem beobachtbaren Schaden führt. Auf die Bedeutung der Elektronenspin-Resonanz (ESR) als Nachweismethode für strahleninduzierte Radikale ist unter anderem von ZIMMER¹ hingewiesen worden. Für die quantitative Strahlenbiologie bietet sie die Möglichkeit, die Radiolyse biochemischer Substanzen im festen Zustand, also weitgehend unabhängig vom umgebenden Medium, zu studieren. Speziell der Schädigung der Desoxyribonucleinsäure (DNS), als Trägerin der genetischen Information, gilt, begünstigt durch die Entwicklung und Verfeinerung der Elektronenspin-Resonanz-Technik, großes Interesse der Strahlenbiologen. Vom Standpunkt der Elektronenspin-Resonanz betrachtet, erscheint die DNS als verhältnismäßig kompliziertes Riesenmolekül insofern, als die eindeutige Identifizierung der strahlen-erzeugten Radikalstellen mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden ist.

Das Interesse vieler ESR-Spektroskopiker konzentriert sich deswegen zunächst auf das radiolytische Verhalten der DNS-Bausteine, der vier Basen, der Desoxyribose und des Monophosphat-Restes. Die ESR-Spektren dieser Komponenten wurden von vielen Autoren eingehend untersucht, insbesondere auch von MÜLLER², der in einer umfassenden Arbeit nicht nur die Spektren der Nucleinsäure-Komponenten, sondern auch diejenigen von Bakteriophagen und deren DNS registrierte. Eine eindeutige Zuordnung und Identifizierung gelang jedoch erst in einem Fall, nämlich bei bestrahlten Thymin-Verbindungen und bestimmten DNS-Präparationen, wo das 5.6-Dihydro-Thymyl-(5)-Radikal entsteht, welches ein sehr signifikantes 8-Linienspektrum liefert³.

Gegenstand dieser Untersuchungen bildet hauptsächlich ein Triplet-Spektrum mit etwa 35 Oe Liniensabstand, wie es zuerst von DORLET, VAN DE VORST und BERTINCHAMPS⁴ in bestrahlter DNS aus Forellen-Spermien registriert wurde. HERAK und

¹ K. G. ZIMMER, Akad. Wiss. Lit. Mainz, Abh. math.-naturwiss. Kl. Nr. 3, 107 [1960].

² A. MÜLLER, Akad. Wiss. Lit. Mainz, Abh. math.-naturwiss. Kl. Nr. 5, 139 [1964].

³ B. L. PRUDEN, W. SNIPES u. W. GORDY, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 917 [1965].

⁴ C. DORLET, A. VAN DE VORST u. A. J. BERTINCHAMPS, Nature [London] 194, 767 [1962].

GORDY⁵ erhielten es, indem sie Purin-Basen einer Wasserstoff-Gasentladung aussetzten. Es wird darüber hinaus auch in Purin-Nucleosiden² und in 9-Äthyl-Guanin⁶ beobachtet.

Methodik

Sehr präzise Auskünfte über Radikalstrukturen erhält man durch Anwendung der Elektronenspin-Resonanz-Methode auf Einkristalle, in deren Gitter die Radikale in maximal geordnetem Zustand festgehalten sind. Die vollständige Beschreibung des Radikals umfaßt dann die Bestimmung der Elemente des g - (Landé)-Tensors und des Kopplungstensors $|A|$. Sie bilden die radikalspezifischen Größen des Spin-Hamilton-Operators der Elektronenspin-Resonanz für freie organische Radikale:

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

Dabei sind \vec{S} und \vec{I} die Operatoren des Elektronen- bzw. Kernspins, H_0 das Zeeman-Feld und $\mu_B = 0,92731 \cdot 10^{-20}$ erg/Oe das Bohrsche Magneton. Aus dem Hamilton-Operator berechnen sich die Wechselwirkungsenergien des ungepaarten Elektronenspins mit dem Magnetfeld H_0 (1. Term) und dem Kernmoment, der sog. Hyperfeinstruktur (2. Term). Für den Tensorcharakter von g ist bei freien organischen Radikalen die Spin-Bahn-Kopplung verantwortlich, während die winkelabhängige Dipolwechselwirkung zwischen Kern- und Elektronenspin bewirkt, daß die Hyperfeinstruktur-Wechselwirkung tensoriell ist. Die Bestimmung der Tensorelemente geschieht nach dem von GEUSIC und BROWN⁷ beschriebenen Verfahren, wobei man den Einkristall um 3 zueinander senkrechte Achsen dreht. Hat man dieses Koordinatensystem so gewählt, daß die 3×3 -Matrizen $|g|$ oder $|A|$ (oder beide) diagonal sind, erkenntlich daran, daß die Sinus-Funktionen $g^2(\phi)$ bzw. $A^2(\phi)$ (ϕ = Drehwinkel) ihre Extremwerte längs der Koordinatenachsen annehmen, dann bilden diese 3 Extremwerte gerade die Hauptwerte der entsprechenden Tensoren. In diesem Falle genügt es, die Winkelvariation von g und A , anstatt von g^2 und A^2 zu registrieren.

Zur ESR-Messung diente ein konventionelles Q-Band-Spektrometer mit drehbarem Magneten und zylindrischem Meßresonator. Durch die Verwendung der hohen Mikrowellenfrequenz von 35 GHz erzielt man große Empfindlichkeit bei kleinem Probevolumen, was sich in Anbetracht der kleinen Kristalle als entscheidender Vorteil erwies. Als Eichsubstanz für den unbekannteren g -Faktor und Linienabstand fand ein Mn^{2+} -Präparat Verwendung, dessen 6 Linien zugleich mit den Spektren der bestrahlten Kristalle in Winkelintervallen von 15° registriert wurden. Die Kristalle selbst befanden sich innerhalb des Resonators in passend her-

gestellten Quarzkapillaren, in die sie zuvor unter dem Mikroskop einjustiert wurden. Während säulenförmige Kristalle von Adenosin·HCl ($4 \cdot 1,5 \cdot 1$ mm) durch langsames Abkühlen salzsaurer Lösungen der reinen Nucleoside in einem transistorbeheizten und elektronisch gesteuerten Thermostaten erhalten wurden, erwies sich langsames Verdunsten einer wäßrigen Lösung für die Kristallplättchen von Desoxyadenosin·H₂O ($5 \cdot 3 \cdot 0,4$ mm) als besonders geeignet. Nach Bestrahlung bei Zimmertemperatur und Luftzutritt mit Dosen von 10^7 rad (Gammacell 220 der Atomic Energy of Canada; $1,5 \cdot 10^6$ rad/h) zeigten die klaren Kristalle charakteristische Verfärbungen. Die Raumgruppen-Bestimmungen wurden von SCHNEIDER⁸ durchgeführt.

Ergebnisse

1. Adenosin·HCl

Abb. 1 zeigt die Festlegung des g -Tenson-Hauptachsensystems x, y und z im Einkristall von Adenosin·HCl. Die Tatsache, daß der Kristall der monoklinen Raumgruppe $P2_1$ angehört⁸ bedingt, daß

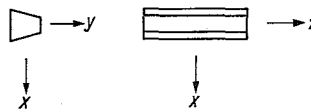


Abb. 1. Hauptachsen des Tensors $|g|$ im Einkristall von Adenosin Hydrochlorid.



Abb. 2. ESR-Spektrum des bestrahlten Einkristalls von Adenosin Hydrochlorid. Das Magnetfeld liegt parallel zur x -Achse.

⁵ J. N. HERAK u. W. GORDY, Proc. nat. Acad. Sci. USA **54**, 1287 [1965].

⁶ A. CHECUCCI, J. DEPIREUX u. J. DUCHESNE, Nature [London] **206**, 925 [1965].

⁷ J. E. GEUSIC u. L. C. BROWN, Physic. Rev. **112**, 64 [1958].

⁸ W. SCHNEIDER, persönliche Mitteilung (1966).

2 Radikalpositionen im Kristallgitter auftreten können, die zwar durch die 2_1 -Symmetrie-Operation (2-zählige Schraubsymmetrie) verbunden, aber magnetisch unterscheidbar sind. Es kann daher Richtungen geben, längs denen sich das typische Adenosin-Triplett (Abb. 2) verdoppelt. Da aber naturgemäß ein und dasselbe Radikal einen eindeutig bestimmten g -Tensor hat, muß aus den zweideutigen Spektren diejenige Komponente herausgesucht werden, die einen widerspruchsfreien und physikalisch sinnvollen g -Tensor liefert. Dies ist die bei tiefem Feld erscheinende Komponente. Verfährt man auf diese Weise, so erhält man bei Drehung um die Achsen x , y und z die in Abb. 3 wiedergegebenen

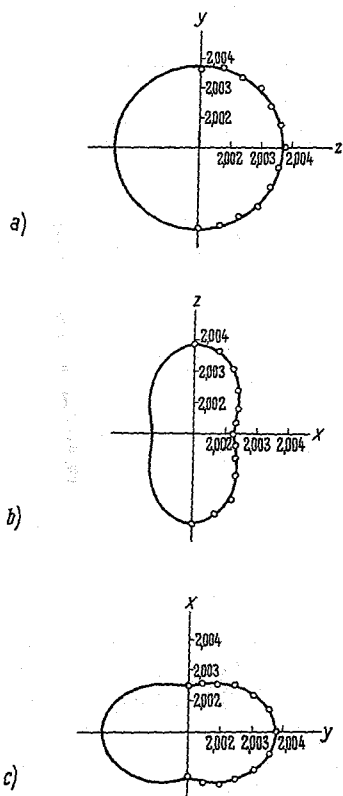


Abb. 3. Polardiagramme des g -Tensors beim Einkristall von Adenosin Hydrochlorid. a) Drehung um x ; b) Drehung um y ; c) Drehung um z .

Winkeldiagramme, aus denen man folgenden diagonalen g -Tensor abliest:

$$|g| = \begin{vmatrix} x & y & z \\ 2,0024 & & \\ & 2,0038 & \\ & & 2,0038 \end{vmatrix} \begin{matrix} x \\ y \\ z \end{matrix} \quad (\pm 0,0002)$$

Der Linienabstand des Adenosin-Triplets (Abb. 2) ist winkelunabhängig und beträgt

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

Größe und Isotropie der Kopplung zeigen, daß die Hyperfeinstruktur von 2 äquivalenten β -Protonen herrührt. Das Spektrum in Abb. 2 besteht also aus einem Triplett mit dem Amplitudenverhältnis 1:2:1, dem aber wenigstens eine weitere zentrale Linie überlagert ist.

2. Desoxyadenosin $\cdot H_2O$

Im Gegensatz zu Adenosin lieferten diese Kristalle in vielen Orientierungen schwache und in den Einzelheiten schwer interpretierbare Spektren, die jedoch alle das oben erwähnte Triplett enthalten. Abb. 4 zeigt das ESR-Spektrum für den günstigsten

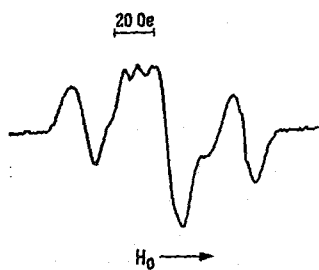


Abb. 4. ESR-Spektrum des bestrahlten Einkristalls von Desoxyadenosin. Das Magnetfeld verläuft parallel zur Längsachse des Kristallplättchens.

Fall, bei dem das Magnetfeld der Längsachse des Plättchens parallel verläuft. Die isotrope Kopplung beträgt

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

und entspricht damit ziemlich genau dem obigen, für das Adenosin erhaltenen Wert. Der zentrale Teil des ESR-Spektrums ist jedoch komplizierter als in Abb. 2.

3. Desoxyguanosin $\cdot HCl$

Die Einkristalle von Desoxyguanosin $\cdot HCl$ waren kleine, leicht zerbrechliche Nadeln mit schlecht ausgeprägten Kristallflächen. Dies erschwerte eine wohldefinierte Festlegung der ESR-Achsen. Die g -Faktoren stimmen weitgehend mit den Elementen des g -Tensors beim Adenosin $\cdot HCl$ überein. Da auch hier die Raumgruppe $P2_1$ vorliegt⁸, gibt es im überraschend starken ESR-Signal, welches wieder von dem typischen Triplett beherrscht wird (Abb. 5 a), Orientierungen, in denen zwei magnetisch unterscheidbare Positionen erscheinen (Abb. 5 b). Die

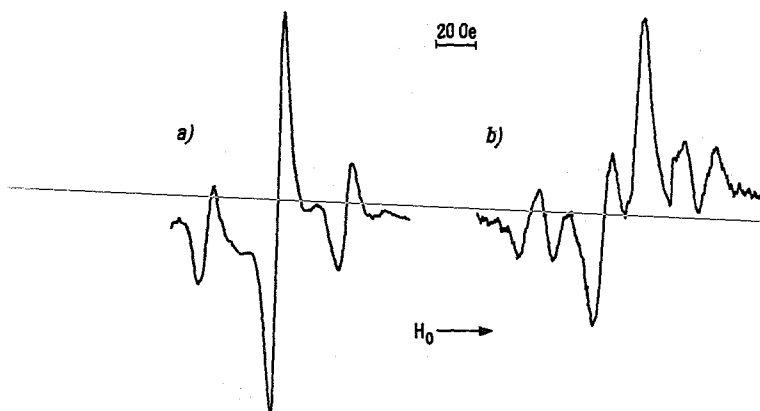


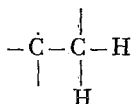
Abb. 5. ESR-Spektren des bestrahlten Einkristalls von Desoxyguanosin Hydrochlorid. a) Magnetisch äquivalente Positionen, b) zwei magnetisch verschiedene Positionen.

Kopplung ist jedoch im Vergleich zu den Adenin-Nucleosiden geringer:

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

Diskussion

Es erhebt sich die Frage, welches Radikal dem isotropen ESR-Triplett der Purin-Nucleoside zugrunde liegt. Nach dem g -Tensor im Falle des Adenosin·HCl-Einkristalls wird man, da in den Spektren überdies keine ^{14}N -Hyperfeinstruktur erkennbar ist, ein Kohlenstoff-Radikal der folgenden Art annehmen:



Ein derartiges Radikal kann aber sicher nicht auf einfache Weise entstehen. Dies gilt sowohl für die Base, als auch für den Zucker, bei dem noch hinzukommt, daß sowohl die Riboside, als auch die Desoxyriboside das gleiche ESR-Triplett liefern. Andererseits entsteht das Radikal aber mit einem G -Wert² von ungefähr 1, und es ist daher zu prüfen, ob nicht in Wirklichkeit doch ein anderes Radikal vorliegt, nämlich ein Stickstoff-Radikal mit anomalem Verhalten.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von HERAK und GORDY⁵ wichtig. Die Autoren exponierten unter anderem die Purin-Basen Adenin und Guanin atomarem Wasserstoff aus einer Wasserstoff-Gasentladung und erhielten als ESR-Signal ein Triplett mit einer Kopplung von etwa 39 Oe. Die analoge Bombardierung mit atomarem Deuterium lie-

ferte ein Duplett von ca. 39 Oe Kopplung, dessen Linien durch die Wechselwirkung mit einem Deuteron stark verbreitert waren, sowie eine zusätzliche Zentrallinie anderer Herkunft. Die Autoren zogen daraus den Schluß, daß ein Wasserstoff-Anlagerungs-Radikal entstanden sei, wobei offenbar der Wasserstoff an eine Position addiert, in der bereits ein Wasserstoffatom sitzt. Da das Triplett ferner für Purin-Derivate charakteristisch und von den Liganden des Pyrimidin-Ringes unabhängig ist, liegt die Radikalstelle mit großer Wahrscheinlichkeit am Imidazolring. Nach den Berechnungen von PULLMAN und MANTIONE⁹ ist dann das sog. 7.8-Dihydro-Adenyl-(Guanyl)-(7)-Radikal (Abbn. 6 und 7) die stabilste

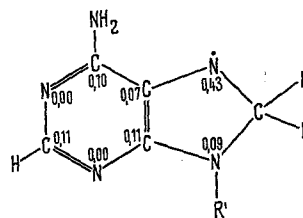


Abb. 6. Das 7.8-Dihydro-Adenyl-(7)-Radikal. Spindichten nach PULLMAN und MANTIONE⁹.

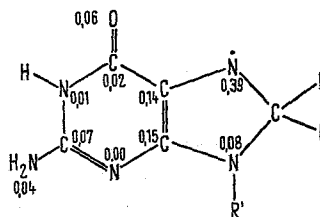


Abb. 7. 7.8-Dihydro-Guanyl-(7)-Radikal. Spindichten nach PULLMAN und MANTIONE⁹.

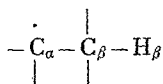
und damit die wahrscheinlichste Struktur. Die Spindichten an $\text{N}_{(7)}$ betragen nach PULLMAN und MANTIONE 0,43 für das Adenyl- und 0,39 für das Guanyl-Radikal. Beim Vergleich mit den hier gemessenen Kopplungen von 39,5 und 35 Oe für das Adenosin bzw. Desoxyguanosin fällt auf, daß sich diese ziemlich genau wie die Spindichten verhalten, was HERAK und GORDY bei den Pulverspektren naturgemäß nicht verifizieren konnten. Dank dieser Übereinstimmung ist man einerseits zu der Folgerung berechtigt, daß in bestrahlten Purin-Nucleosiden tatsächlich die von PULLMAN und MANTIONE berechneten Radikale entstehen. Man ist darüber hinaus sogar in der Lage, eine bisher nicht bekannte Kopplungskonstante für

⁹ B. PULLMAN u. M. J. MANTIONE, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. 260, 5643 [1965].

Stickstoff-Radikale abzuschätzen. Die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons, welches im allgemeinen das 2p-Orbital senkrecht zur Radikalebene einnimmt, mit β -ständigen Protonen (Hyperkonjugation) genügt folgender Beziehung¹⁰

$$A = (B_0 + B_1 \cos^2 \Theta) \rho; \quad B_0 \ll B_1.$$

Dabei sind B_0 und B_1 Konstanten, die z. B. für Fragmente des Typs



folgende Werte annehmen¹¹:

$$B_0 = 3,6 \text{ Oe}; \quad B_1 = 50 \text{ Oe},$$

ρ ist die Spindichte am Zentralatom (C_α) und Θ der Winkel zwischen der $C_\beta - H_\beta$ -Richtung und der 2p-Orbitalachse, projiziert in eine Ebene senkrecht zur $C_\alpha - C_\beta$ -Bindung. Nimmt man für N-Radikale wieder $B_0 \ll B_1$ an, so gilt:

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

Bei Annahme einer Tetraeder-Bindung der β -Protonen ($\Theta \approx 30^\circ$) folgt mit den entsprechenden Wertepaaren ρ und A der erwartungsgemäß hohe Wert von:

$$B_1 \approx 120 \text{ Oe}$$

für N-Radikale mit am Nachbarkohlenstoff gebundenen Protonen.

Es bleibt noch die Frage zu beantworten, weshalb die hier registrierten ESR-Spektren keine ¹⁴N-Hyperfeinstruktur zeigen, was sicherlich auch für die Spektren von HERAK und GORDY⁵ zutrifft, obwohl diese Autoren glauben, sie in der geringfügig asymmetrischen Linienform zu erkennen. Auf diese Frage gibt es noch keine endgültige Antwort, wenngleich entsprechende Beobachtungen schon von mehreren Autoren gemacht wurden. Ihre Ergebnisse lassen sich so formulieren, daß die Übergänge $m = \pm 1$ des Kernspins beim Stickstoffatom unterdrückt sind, sobald die Rotation der Radikalstelle behindert ist. Bestätigt wird dieser Befund recht eindrucksvoll durch die Ergebnisse von HYDE und FREEMAN¹². Durch Bestrahlung von Ammoniumperchlorat-Einkristallen erzeugten sie das Radikal NH_3^\ominus . Beim langsamen Abkühlen eines solchen Kristalls ver-

schwanden bei 170 °K die beiden äußeren Linien des Stickstoff-Tripletts. HYDE und FREEMAN machten die bei sinkender Temperatur stufenweise einfrierende Rotation des Radikals für den beobachteten Ausfall der ¹⁴N-Hyperfeinstruktur verantwortlich. In einem ähnlichen Experiment erzeugten AL-NAIMY, MOORTHY und WEISS¹³ in gefrorenen Ammoniak-Wasser-Systemen das Radikal NH_2 , dessen Rotation durch die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken zu den Wassermolekeln ebenfalls behindert ist. Die Folge davon ist wieder ein Ausfall der ¹⁴N-Kopplung, die jedoch sofort wieder auftritt, wenn man in einer Argon-Matrix arbeitet, in der kein Wasserstoff-Brücken-System möglich ist. Von der behinderten Rotation wird höchstwahrscheinlich auch der g-Faktor betroffen, dessen Mittelwert bei den Experimenten von HYDE und FREEMAN¹² und offensichtlich auch von HERAK und GORDY⁵ bei 2,0034 lag, während man bei N-Radikalen im allgemeinen Werte von 2,0050 erwartet¹⁰.

Dieser Tatbestand der behinderten Rotation trifft, wie unmittelbar einzusehen ist, auch für das 7.8-Dihydro-Adenyl (Guanlyl)-(7)-Radikal zu, so daß hiermit die Anomalien dieses Radikals befriedigend erklärt werden können. Darüber hinaus entnimmt man aus Abb. 2, daß die „verbotenen“ ¹⁴N-Übergänge nicht vollständig unterdrückt sind, sondern als eben noch erkennbare Satelliten erscheinen und vor allem rechts und links der Zentrallinie durch Überlagerung eine Abschrägung der Nulllinie bewirken. Zur vollständigen Beschreibung des Spektrums in Abb. 2 gehört noch eine Bemerkung über dessen zentralen Teil. Genauere Auswertungen aller Adenosin-Spektren zeigen, daß der Mittellinie des Triplets 2 Einzellinien überlagert sind, die sich in ihrem Anisotropieverhalten voneinander unterscheiden. Während bei der einen keine Positionsaufspaltung erkennbar ist, folgt die andere in dieser Hinsicht wie auch im g-Faktor ziemlich genau dem Triplett, so daß ihre Anwesenheit meist nur dessen Amplitudenverhältnis 1:2:1 verfälscht. Dieses Verhalten beobachtet man auch in den ESR-Spektren von Desoxyguanosin·HCl (Abb. 5), und man kann hieraus mit einiger Berechtigung schließen, daß die zugehörige Radikalstelle spiegelsymmetrisch zur Radikalstelle $N_{(7)}$ des Triplets lokalisiert ist, d. h. also an der Position

J. R. MORTON, Chem. Reviews 64, 453 [1964].
D. H. WHIFFEN, persönliche Mitteilung (1966); J. chim. Physics, im Druck.

¹² J. S. HYDE u. E. S. FREEMAN, J. physic. Chem. 65, 1636 [1961].

¹³ B. S. AL-NAIMY, P. N. MOORTHY u. J. J. WEISS, J. physic. Chem. 70, 3654 [1966].

$N_{(9)}$ des Purin-Ringes. Ein solches Radikal, das mit großer Wahrscheinlichkeit auch bei den Versuchen von HERAK und GORDY infolge Wasserstoff-Abstraktion durch atomaren Wasserstoff entstanden ist, würde in diesem Fall durch Trennung der *N*-Glycosid-Bindung zum Zucker zustande kommen, was vom Standpunkt der Strahlenbiologie aus eine Mutation bedeuten kann. Der Ausfall der ^{14}N -Kopplung er-

klärt sich dabei wieder durch Behinderung der Rotation des Radikals. Über die andere paramagnetische Komponente, die in allen Orientierungen ein eindeutiges Singulett liefert, kann in diesem Zusammenhang nichts ausgesagt werden.

Herrn Prof. Dr. K. G. ZIMMER und Herrn Priv.-Doz. Dr. A. MÜLLER danke ich für nützliche Ratschläge und klärende Diskussionen.

Der Ursprung des ESR-Dubletts in der Nucleinäurebase Cytosin: eine Einkristallstudie bei 8 mm Wellenlänge

HERMANN DERTINGER

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforsch. 22 b, 1266—1269 [1967]; eingegangen am 5. April 1967)

An ESR-study on an irradiated single crystal of cytosine monohydrate shows a hydroxy-radical to be formed by addition of a hydrogen atom to the $C(2)=O$ -double bond which gives rise to a characteristic doublet spectrum.

Neben den strahlenchemischen Untersuchungen biologischer Substanzen, die meistens in wäßriger Lösung durchgeführt werden, sind die Elektronenspin-Resonanz (ESR)-Experimente mit bestrahlten trockenen Pulvern von großer Bedeutung. Da man hierbei unabhängig ist von der zufälligen Wahl des chemischen Milieus, und diffusionsbedingte chemische Sekundärprozesse im allgemeinen stark verlangsamt sind, erfaßt man den Strahlenschaden meist in einem sehr frühen, dem physiko-chemischen Stadium, innerhalb dessen chemische Bindungen zerstört und Radikale erzeugt werden. Von besonderem strahlenbiologischen Interesse ist die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Nucleinsäuren und ihre Komponenten. ESR-Experimente an Einkristallen solcher Nucleinsäure-Bausteine, aus denen sich eindeutige Schlüsse über Art und Struktur der strahlen-erzeugten Radikale ziehen lassen, wurden bis jetzt in zwei Fällen durchgeführt^{1,2}. Die vorliegende ESR-Untersuchung an Einkristallen von Cytosin Monohydrat dient der Identifizierung des Cytosin-Radikals, dessen ESR-Spektrum im wesentlichen

aus einem Dublett von etwa 10 Oe Linienabstand besteht^{3,4}.

Methodik

Die schwere Kristallisierbarkeit der für die Strahlenbiologie interessanten Verbindungen erfordert im allgemeinen, daß man, zur Steigerung der Volumempfindlichkeit, mit hoher Mikrowellenfrequenz arbeitet. Aus diesem Grunde wurden die Messungen bei 35 GHz und einem Zeeman-Feld von 12 KOe durchgeführt. Das Spektrometer war mit einem zylindrischen Resonator und drehbarem Magneten ausgerüstet, so daß die Kristalle fest in den Resonator einjustiert werden konnten, während der Magnet um diesen gedreht wurde. Die Einkristallspektren wurden jeweils in Winkelintervallen von 15° zusammen mit einem Mn^{2+} -Eichpräparat registriert. Die Grundlagen der Auswertung der Spektren wurden früher beschrieben^{2,5,6}. Klare, aber mit der Zeit verwitternde Kristallplättchen von Cytosin Monohydrat bilden sich verhältnismäßig leicht beim Verdunsten wäßriger Lösungen. Sie wurden anschließend der $Co-\gamma$ -Bestrahlung mit Dosen bis zu 10⁷ rad unterworfen. Die Festlegung des ESR-Achsen-systems (x, y, z) erfolgte, wie in Abb. 1 dargestellt, in Anlehnung an die kristallographischen Achsen a, b und c ⁷.

¹ B. L. PRUDEN, W. SNIPES u. W. GORDY, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 917 [1965].

² H. DERTINGER, Z. Naturforsch. 22 b, 1261 [1967].

³ W. KÖHNLEIN, Strahlentherapie 122, 437 [1963].

⁴ A. MÜLLER, Akad. Wiss. Lit. Mainz, Abh. math. naturwiss. Kl. 5, [1964].

⁵ L. A. BLUMENFELD, W. W. WOJEWODSKI u. A. G. SEMJONOV Akad. Verlagsges. Frankfurt/M. 1966.

⁶ J. E. GEUSIC u. L. C. BROWN, Physic. Rev. 112, 64 [1958].

⁷ H. A. ROSE, Analyt. Chem. 27, 158 [1955].

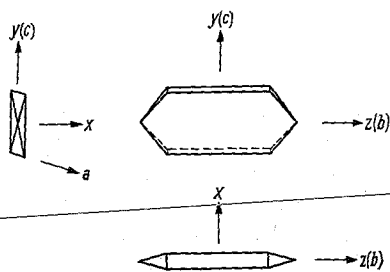


Abb. 1. ESR-Achsen x , y und z im Einkristall von Cytosin Monohydrat; a , b und c sind die kristallographischen Hauptachsen nach Rose⁷.

Ergebnisse

Abb. 2 zeigt das typische Cytosin-Spektrum für den Fall, daß die y -Achse dem Magnetfeld parallel liegt. Außer dem dominierenden Dublett erkennt

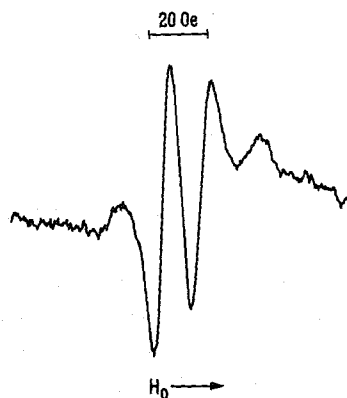


Abb. 2. ESR-Einkristall-Spektrum von Cytosin Monohydrat. Das Magnetfeld liegt parallel zur y -Achse.

man noch Linien, die mit großer Wahrscheinlichkeit zum Typus des 5.6-Dihydro-Uracil-(5)-Radikals gehören, das hier durch Addition von atomarem Wasserstoff gebildet wird⁸. Aus den Polardiagrammen der Dublett-Aufspaltung (Abb. 3) gewinnt man den im x, y, z -System diagonalen Kopplungstensor $|A|$, der auf folgende Weise in einen isotropen Kontakt- und einen anisotropen Dipol-Anteil mit verschwindender Spur zerlegt wird⁹:

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

Der Tensor $|g|$ ist im System (x, y, z) nicht diagonal, weshalb in Abb. 4 die Polardiagramme von

⁸ J. N. HERAK u. W. GORDY, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 1287 [1965].
⁹ J. R. MORTON, Chem. Reviews 64, 453 [1964].

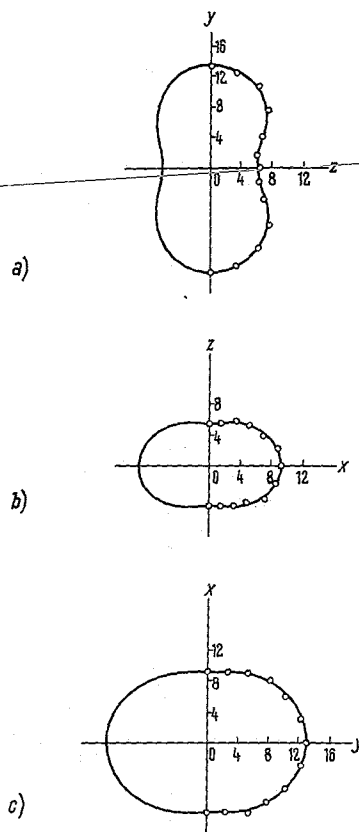


Abb. 3. Polardiagramme des Kopplungsfaktors A beim Einkristall von Cytosin Monohydrat. a) Drehung um x ; b) Drehung um y ; c) Drehung um z .

g^2 wiedergegeben sind, aus denen ein Tensor der folgenden Art resultiert:

$$|g^2| = \begin{vmatrix} 4,0060 & 0,0043 & 0 \\ 0,0043 & 4,0232 & \\ 0 & 0 & 4,0172 \end{vmatrix}$$

Wie man sieht, erstreckt sich die auszuführende Hauptachsentransformation nur auf die (x, y) -Untermatrix von $|g^2|$ und besteht daher in einer Drehung um die z -Achse. Bei der Drehung um den Winkel $\delta \sim 13,5^\circ$ wird der Tensor auf die folgende Diagonalgestalt gebracht:

$$|g| = \begin{vmatrix} 2,0014 & & \\ & 2,0059 & \\ & & 2,0043 \end{vmatrix} \quad (\pm 0,0002).$$

Vergleicht man diesen Tensor mit Werten aus der Literatur^{10, 11}, so muß man dem Cytosin-Radikal

¹⁰ N. M. ATHERTON u. D. H. WHIFFEN, Molecular Physics 3, 1 [1960].
¹¹ N. M. ATHERTON u. D. H. WHIFFEN, Molecular Physics 3, 103 [1960].

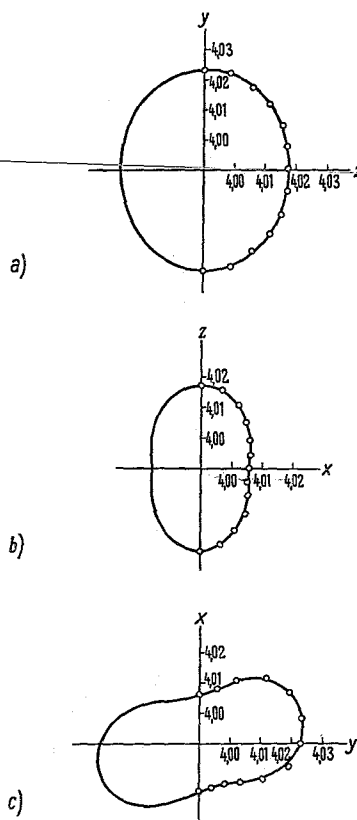


Abb. 4. g^2 -Polardiagramme beim Einkristall von Cytosin Monohydrat. a) Drehung um x ; b) Drehung um y ; c) Drehung um z .

eine Struktur der Art $=\dot{C}-OH$ zuordnen. Damit steht auch der Kopplungstensor $|A|$ in Einklang, der ausschließt, daß das wechselwirkende Proton sich in α -Stellung zum Kohlenstoff befindet. Mithin kann nur das Hydroxy-Radikal in Abb. 5 vorliegen.

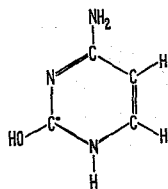


Abb. 5. Das Hydroxy-Radikal des Cytosins.

Diskussion

Es ist sehr aufschlußreich, die ESR-Spektren des Cytosin-Radikals im Zusammenhang mit der Kristallstruktur zu betrachten. Nach den kristallographi-

schen Untersuchungen von JEFFREY und KINOSHITA¹² gehört das Cytosin Monohydrat der Raumgruppe $P2_1/c$ an. Die Gitterpunkte des monoklinen Kristalls sind also durch eine zweizählige Schraubung in Richtung der b -Achse mit anschließender Gleitspiegelung längs c ineinander überführbar. An sich könnten daher zwei magnetisch unterscheidbare Positionen im Kristall auftreten. Dies ist hier jedoch nicht der Fall, da die ESR-Spektren keine Positionsaufspaltung zeigen. Hieraus folgt, daß die Ebenen der Cytosin-Moleküle und damit der Radikale im Kristallgitter parallel bzw. antiparallel angeordnet sind. Dies trifft auch tatsächlich zu¹², und zwar liegen im Prinzip die in Abb. 6 dargestellten, durch Wasserstoff-Brük-

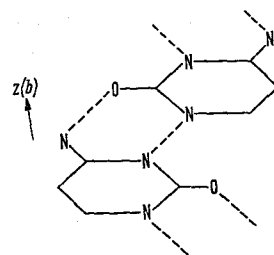


Abb. 6. Molekül-Bänder im Kristallgitter des Cytosin-Monohydrats.

ken gebildeten, parallelen Molekülbänder vor. Benachbarte Moleküle und Bänder sind durch die $2_1/c$ -Symmetrie miteinander verknüpft, wodurch eine Stufung der Bänder zustande kommt.

Die Kenntnis der Kristallstruktur und der Kontakt-Wechselwirkung von $A_{iso} = 9,3$ Oe, die für β -ständige Protonen als Hyperkonjugation bezeichnet wird, gestattet noch eine Abschätzung der Spindichte ρ an $C_{(2)}$ des Cytosin-Radikals. Es besteht der folgende Zusammenhang zwischen ρ , A_{iso} und θ , der Projektion des Winkels, den die $2p$ -Orbitalachse des ungepaarten Elektrons an $C_{(2)}$ mit der O-H-Bindung bildet, in eine Ebene senkrecht zur C-O-Bindung⁹:

$$A_{iso} = (B_0 + B_1 \cos^2 \theta) \rho.$$

Die Konstanten haben für Hydroxy-Radikale die Werte¹³:

$$B_0 = -3,2 \text{ Oe}; \quad B_1 = 30,5 \text{ Oe}.$$

Man kann nun annehmen, daß sich das vorliegende Radikal durch die Zerstörung einer vom Sauerstoff-Atom des Cytosin-Moleküls ausgehenden

¹² G. A. JEFFREY u. Y. KINOSHITA, Acta crystallogr. [Copenhagen] 16, 20 [1963].

¹³ D. H. WHIFFEN, persönliche Mitteilung (1966); im Druck (J. chim. Physics).

Wasserstoff-Brücke bildet, wobei sich das offenbar instabile Restradikal dem ESR-Nachweis entzieht. Da von diesem Sauerstoff drei Wasserstoff-Brücken ausgehen, und deren Koordination regulär und eben ist¹², kann näherungsweise $\Theta = 30^\circ$ gesetzt werden. Dies ergibt:

$$g \approx 0,47.$$

Von zentraler strahlenbiologischer Bedeutung ist die Frage nach der genetischen Wirksamkeit des Cytosin-Radikals. Nicht nur im Kristall, sondern auch in der Desoxyribonucleinsäure (DNS), wo sich Cytosin mit der Purinbase Guanin paart, sind die Wasserstoff-Brücken an der C=O-Gruppe des Cytosins betätigt. Ihre Zerstörung könnte eine Mutation bedingen.

ESR-Dubletts mit einer isotropen Aufspaltung < 20 Oe werden außer bei Cytosin noch bei Uridin, Uridyl- und Thymidylsäure¹⁴ sowie bei Desoxyuridin und Thymin⁴ bei tiefen Temperaturen erhalten. Nach den Zusammenstellungen von MORTON⁹ sind

solche Aufspaltungen für α -ständigen Wasserstoff atypisch, und es ist daher sehr wahrscheinlich, daß auch hier Hydroxy-Radikale vorliegen. Man kann vermuten, daß dieser Radikaltypus eine mutagene Wirkung hat und für die Strahlenbiologie an Bedeutung gewinnt. In diesem Zusammenhang sei abschließend auf die ESR-Experimente von VAN DE VORST und VILLÉE¹⁵ hingewiesen, aus denen diese Autoren schließen, daß die Spektren bestimmter DNS-Präparate von Cytosin- und Guanin-Radikalen erzeugt werden.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. G. ZIMMER und Herrn Priv.-Doz. Dr. A. MÜLLER für viele Ratschläge und klärende Diskussionen.

A n m. b. d. K o r r. : Die zu den Satelliten-Linien in Abb. 2 gehörenden Radikale wurden inzwischen von J. B. COOK, J. B. ELLIOT und S. J. WYARD, *Molecular Physics* 13, 49 [1967] identifiziert.

¹⁴ M. G. ORMEROD, *Int. J. Rad. Biol.* 9, 291 [1965].

¹⁵ A. VAN DE VORST u. F. VILLÉE, *C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci.* 259, 928 [1964].