

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

November 1968/April 1969

KFK 971

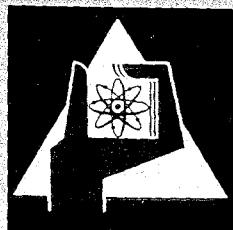
Institut für Strahlenbiologie

Radical Formation in Cysteamine Free Base and Cystamine · 2HCl by
Reaction with Atomic Hydrogen and by Gamma-Irradiation

W. Freyland, A. Müller

Elektronen-Spin-Resonanz an γ -bestrahlten Einkristallen von
2-Desoxy-D-Ribose

J. Hüttermann, A. Müller



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

CORRESPONDENCE

Radical formation in cysteamine free base and cystamine . 2HCl by reaction with atomic hydrogen and by gamma-irradiation

WERNER FREYLAND and ADOLF MÜLLER

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, Germany

(Received 20 August 1968; revision received 20 September 1968)

Sulphhydryl and disulphide compounds are known for their radioprotective effect on elementary biological systems, such as proteins and bacteriophage. However, basic problems concerning the detailed mechanism of the protective action remain unsolved. Rationalization of the existing experimental evidence has been attempted repeatedly and by various authors. One of the resulting hypotheses, proposed by Braams (1963), links the protective action to the ability of the compounds considered to scavenge small radiation-produced radicals, especially hydrogen atoms. To learn more about such reactions in the dry state, where protection has been shown to occur, as well as in aqueous solution, we have compared electron spin resonance spectra of radicals produced in polycrystalline protective compounds by gamma-radiation and by interaction with atomic hydrogen generated directly in a gas discharge.

Cysteamine was obtained as a free base from Fluka, Switzerland, cystamine . 2HCl from various sources (Fluka; Nutritional Biochemicals; Calbiochem). The substances were prepared for our investigations either by lyophilization or by sublimation *in vacuo*. Both methods reduced the average crystal size of the material considerably, entailing a corresponding increase of accessible surface area. Atomic hydrogen was generated within a glass tube using an electrodeless discharge at 30 kHz frequency. Great care was taken to avoid a possible contribution of u.v.-light from the discharge to the radical production. The experiments were performed at room temperature and at a hydrogen pressure of about 15 torr. Exposure times varied between 15 and 120 min. After reaction with atomic hydrogen samples were evacuated and sealed. The experimental arrangement used was a modified version of that described by Jung and Kürzinger (1968).

Gamma-irradiations were performed in a ⁶⁰Co-source at a dose-rate of 1.25 Mrads per hour. Several measurements were done after irradiation of samples with u.v.-light of 253.7 nm wave-length. For E.S.R. measurements a spectrometer working at 9.3 GHz (AEG) was used. A crystal of diphenylpicrylhydrazyl was employed for calibration of the *g*-factor at a value of 2.0036. Several spectra were recorded with a second E.S.R. spectrometer at 34.5 GHz in order to detect variations of spectra with magnetic field strength.

First derivative E.S.R. spectra of H-exposed cysteamine and cystamine . 2HCl are represented in figure 1. The centre of the cysteamine spectrum (figure 1 (a)) is characterized by a *g*-factor of 2.034. This high value already indicates the stabilization of the radical electron at the sulphur atom. The *g*-factors

corresponding to the extreme left maximum, the base-line crossing, and the extreme right minimum, represent the three principal elements of the g -tensor (Kneubühl 1960). The numerical values determined on this basis: $g_1=2.047$, $g_2=2.029$, $g_3=2.002$, are in good agreement with results obtained after gamma-irradiation of single crystals of cystine . 2HCl by Kurita and Gordy (1961) and of polycrystalline cysteine, cysteamine . HCl and penicillamine by Henriksen (1962). Supported by this evidence, the predominant production of the radical

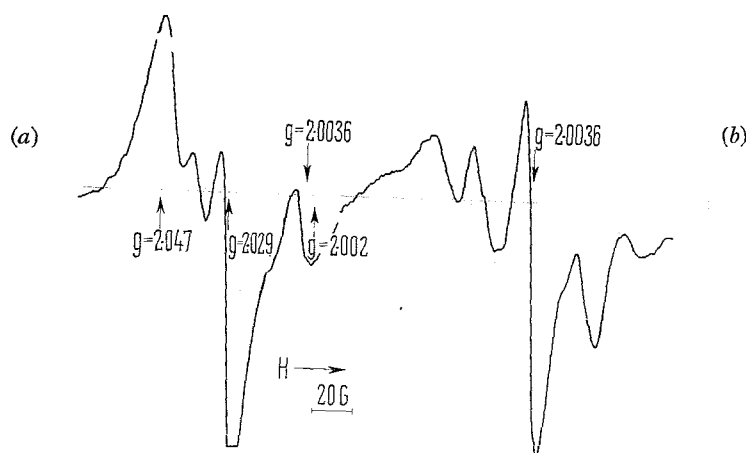
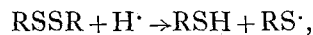


Figure 1. First derivative E.S.R. spectrum of dry, powdered cysteamine free base (a) and cysteamine . 2HCl (b) at 9.3 GHz after exposure to discharge-produced atomic hydrogen.

RS^{\cdot} , when cysteamine is exposed to atomic hydrogen, is concluded. However, the observed E.S.R. spectrum only partially resembles the typical sulphur pattern due to the superposition of additional hyperfine lines originating presumably from a second radical. For the same reason, any possible hyperfine interaction from non-sulphur atoms of the sulphur radical cannot be resolved. Of the diverse mechanisms of the protective action that have been advanced, this result has the most direct bearing on the reaction:



proposed by Braams (1963) as the crucial protective process of sulphhydryl compounds RSH. The E.S.R. spectrum of the H-exposed cysteamine . 2HCl shown in figure 1 (b) is composed of at least two parts: a quintet centred at $g=2.003$ with a mean splitting of 26 Oe and a sulphur pattern appearing at low magnetic-field strength. The latter is assumed to originate from the reaction:



while the quintet is attributed to an unknown non-sulphur radical.

For comparison, we also recorded E.S.R. spectra following gamma- or u.v.-irradiation. Cysteamine . 2HCl yielded a sulphur pattern with both types of radiation. The u.v.-induced spectrum shows an absorption line on the high-field side which cannot be seen after H-exposure. This fact demonstrates that u.v. does not contribute appreciably to the latter. A sulphur spectrum is also found after absorption of u.v.-light by cysteamine free base indicating production of

RS \cdot -radicals. Contrary to expectation this spectral component is completely absent after gamma-irradiation. In this case an E.S.R. spectrum is recorded which has not been reported previously. It is shown in figure 2 at E.S.R. frequencies of 9.3 and 34.5 GHz. In both parts of figure 2, a triplet spectrum with intensity ratios of 1 : 2 : 1, a mean g -factor of 2.0055, and a hyperfine splitting of 25 Oe is prominent. These data are closely analogous to those obtained with N \cdot H $_2$ (Foner, Cochran, Bowers and Jen 1958, Al-Naimy, Moorthy and Weiss 1966),

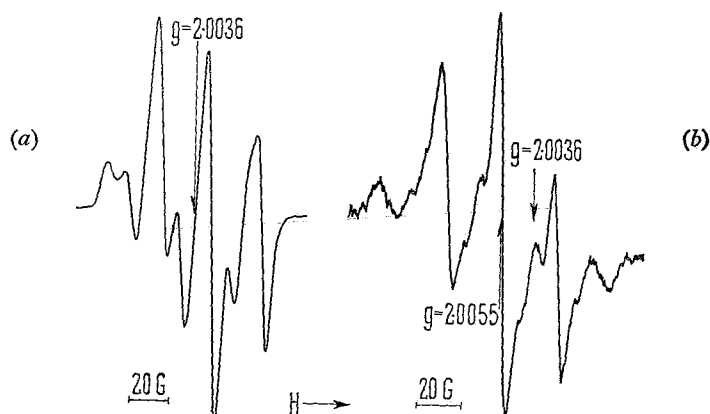


Figure 2. First derivative E.S.R. spectrum of gamma-irradiated cysteamine free base at microwave frequencies of 9.3 GHz (a) and 34.5 GHz (b). Samples were irradiated *in vacuo* and measured at 300°K.

suggesting the presence of such radicals. The triplet is superimposed on a second spectral component of slightly different g -factor, which may be seen at both frequencies but is more conspicuous at 9.3 GHz in figure 2 (a). This is probably due to the presence of a second type of radical which has not been identified. However, the g -factor of both spectra are sufficiently close to the free electron value to exclude sulphur radicals. Since H-atoms give rise to a sulphur pattern as has been shown above it is concluded that the production of atomic hydrogen by gamma-radiation is not an effective process. Apparently rupture of molecules into larger fragments is favoured which may well be due to the large amounts of energy deposited by gamma-radiation. This view is supported by our observation that RS \cdot -radicals are found not only after exposure to H-atoms but also after irradiation with U.V.-light.

REFERENCES

- AL-NAIMY, B. S., MOORTHY, P. N., and WEISS, J. J., 1966, *J. phys. Chem., Ithaca*, **70**, 3654.
 BRAAMS, R., 1963, *Nature, Lond.*, **200**, 752.
 FONER, S. N., COCHRAN, E. L., BOWERS, V. A., and JEN, C. K., 1958, *Phys. Rev. Lett.*, **1**, 91.
 HENRIKSEN, T., 1962, *J. chem. Phys.*, **37**, 2189.
 JUNG, H., and KÜRZINGER, K., 1968, *Radiat. Res.* (in the press).
 KNEUBÜHL, F. K., 1960, *J. chem. Phys.*, **33**, 1074.
 KURITA, Y., and GORDY, W., 1961, *J. chem. Phys.*, **34**, 282.

Elektronen-Spin-Resonanz an γ -bestrahlten Einkristallen von 2-Desoxy-D-Ribose

JÜRGEN HÜTTERMANN und Adolf MÜLLER

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum,
 Karlsruhe

(Z. Naturforsch. 24 b, 463—464 [1969]; eingeg. am 16. November 1968)

Wir haben durch ionisierende Strahlung im DNS-Zucker, 2-Desoxy-D-Ribose, erzeugte stabile freie Radikale mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Methode untersucht. Hierzu wurden Einkristalle der Substanz, welche aus Acetonlösungen gezüchtet wurden, bei 300 °K in einer ^{60}Co -Quelle bis zu Dosen von 0,4 Mrad bestrahlt und in einem konventionellen Spektrometer (AEG) gemessen. Die verwendete Mikrowellenfrequenz lag bei 35 GHz (Q-Band). Durch Drehung der Kristalle im Magnetfeld um drei zueinander senkrechte Achsen wurde die Winkelabhängigkeit des g -Faktors und der Hyperfeinstruktur der Radikale registriert. Diese Methode ermöglicht oft eine eindeutige Identifizierung der den Spektren zugrunde liegenden Radikalstrukturen.

In der Abb. 1 wird ein Spektrum gezeigt, bei dem das Magnetfeld H parallel zur ab-Ebene des Kristalls liegt. In diesem Fall besteht das Spektrum im wesentlichen aus fünf Linien mit einer Aufspaltung von etwa 10,5 Gauss und einem Amplitudenverhältnis der Linien von etwa 1:4:6:4:1, wie es durch die Balken unter dem Spektrum angezeigt wird. Bei Drehung des Kristalls im Magnetfeld erweist sich diese Liniengruppe hinsichtlich ihres g -Faktors und des Linienabstandes als nahezu isotrop mit mittleren Werten von 2,005 für den g -Faktor und 10,5 Gauss für die Hyperfein-Aufspaltung.

Neben dieser Quintettgruppe wurden in den Spektren weitere, weniger intensive Linien beobachtet, von denen eine am rechten Ende des Spektrums in Abb. 1 zu sehen ist. Die zu diesen Linien gehörenden Radikalstrukturen konnten bislang noch nicht aufgeklärt werden. Unsere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß Linien mindestens zweier weiterer Radikale in den Spektren vorliegen, wie in einer anderen Arbeit ausführlich diskutiert wird¹.

Aus den obigen Daten für das Quintett-Spektrum wird geschlossen, daß ein Kohlenstoffradikal vorliegt, dessen Hyperfeinstruktur durch Wechselwirkung des Radikalelektrons mit vier äquivalenten Protonen in β -Position verursacht wird. Diese Konfiguration ist nur

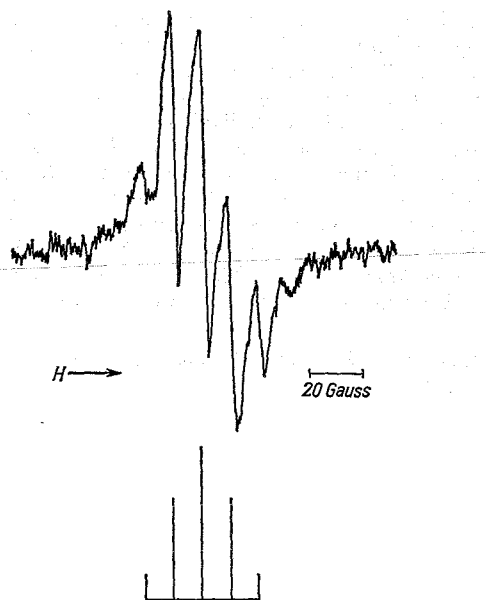
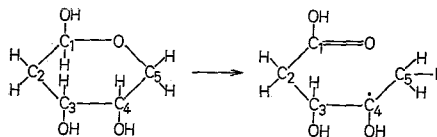


Abb. 1. ESR-Spektrum (1. Ableitung) eines bestrahlten Desoxyribose-Einkristalls. Das Magnetfeld H liegt parallel zur ab-Ebene. Die Balken unter dem Spektrum geben die theoretischen Linienpositionen und -amplituden des vorherrschenden Radikals an.

möglich unter der Annahme einer strahleninduzierten Umordnung von Atomen in der Desoxyribose. Unter Berücksichtigung der Befunde aus der γ -Radiolyse von Kohlehydraten im festen Zustand² nehmen wir die Dissoziation eines H-Atoms von der Pentose an. Der Pyranosering, den die Desoxyribose in den von uns benutzten Einkristallen bildet, geht dann durch intramolekularen Wasserstofftransfer bei simultanem Ringbruch entsprechend dem folgenden Schema



¹ J. HÜTTERMANN u. A. MÜLLER, Radiat. Res. 37 [1969], im Druck.
² S. S. JACOBS, Thesis, University of Colorado (1962).

in das dargestellte Radikal über. Diese Annahmen werden gestützt durch Infrarotspektren bestrahlter fester Desoxyribose, welche gegenüber den unbestrahlten Kontrollen eine starke Absorptionsbande bei etwa 1730 cm^{-1} aufweisen, die von C=O-Schwingungen herrührt.

Dieses Ergebnis unserer Untersuchungen kann vielleicht einen Beitrag zur Aufklärung der Bedeutung der Desoxyribose bei der Wirkung ionisierender Strahlung auf DNS liefern. Hierbei soll zwischen einer direkten und einer mehr indirekten Rolle des Zuckers unterschieden werden. Letztere ergibt sich aus der Tatsache, daß die in Einkristallen von Nucleosiden nach Bestrahlung beobachteten Radikale fast ausschließlich durch Wasserstoffanlagerung an die jeweiligen Basen gebildet werden, obwohl aus quantitativen Untersuchungen bekannt ist, daß die Radikalausbeuten der freien Pentosen weitaus größer sind, als die der Basen. Hieraus wurde auf einen Energietransfer vom Zucker zur Base geschlossen, der später durch ESR-Untersuchungen an bestrahlten molekularen Mischungen von Base und Zucker als Transfer von atomarem Wasserstoff gedeutet werden konnte. Die Fähigkeit atomaren Wasserstoffs zur Reaktion mit organischen Molekülen oder zur Schä-

digung biologisch aktiver Objekte konnte auf direktem Wege in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden^{3,4}. Das in unseren Untersuchungen an Einkristallen reiner Desoxyribose gefundene Radikal stützt die Hypothese des Wasserstofftransfers, da es ein direktes Folgeprodukt der Dissoziation eines Wasserstoffatoms vom Pyranosering ist. Der so freigesetzte Wasserstoff könnte durch Diffusion an die Basen zu den beobachteten Anlagerungsradikalen führen.

Die Frage nach einer direkten Verknüpfung des bei Zimmertemperatur in bestrahlter Desoxyribose vorherrschenden Radikals mit dem Strahlenschaden der DNS kann natürlich nicht in einfacher Weise beantwortet werden. Es liegt jedoch nahe, anzunehmen, daß als Folgeaktion, etwa bei Auflösen bestrahlten Zuckers in Wasser, eine Fragmentierung des Moleküls erfolgt. Diese Annahme wird durch strahlenchemische Befunde gestützt². Man kann daraus folgern, daß das hier gefundene Radikal als Vorstufe von Brüchen in der Polynucleotidkette der DNS angesehen werden kann, die einen sehr bedeutenden Anteil an der biologischen Strahlenschädigung haben.

³ J. HERAK u. W. GORDY, Proc. nat. Acad. Sci. USA **54**, 1287 [1965].

⁴ H. JUNG u. K. KÜRZINGER, Radiat. Res. **36** [1968], im Druck.