

Gasphasenreaktionen

Bindungsselektive H^- -Abspaltung von Thymin**

Sylwia Ptasińska, Stephan Denifl, Verena Grill,
Tilmann D. Märk, Paul Scheier,* Sascha Gohlke,
Michael A. Huels und Eugen Illenberger

Durch Sekundärelektronen ausgelöste Reaktionen in lebenden Zellen sind bekanntlich ein wichtiger erster Schritt bei der Entstehung von Strahlenschäden.^[1,2] Der Grund ist, dass Elektronen mit kinetischen Anfangsenergien von bis zu einigen 10 eV die häufigsten Sekundärprodukte von hochenergetischer Strahlung sind.^[3] Diese anfänglich relativ schnellen Sekundärelektronen sind im bestrahlten Material allerdings nur für eine kurze Zeit (Femtosekunden bis Picosekunden) vorhanden, während der sie durch Stöße, die weitere Ionisations- und Anregungsprozesse auslösen können, abgebremst werden und ihrerseits reaktive Produkte wie neutrale Radikale, Ionen und Elektronen erzeugen. Sind die kinetischen Energien ausreichend niedrig, können die langsamen Elektronen an bestimmten Stellen der Moleküle eingefangen werden und führen so zu einem angeregten

[*] Mag. S. Ptasińska, Mag. Dr. S. Denifl, Mag. Dr. V. Grill,
Prof. Dr. T. D. Märk, Prof. Mag. Dr. P. Scheier
Institut für Ionenphysik
Universität Innsbruck und Center for Molecular Biosciences
Innsbruck (CMBI)
Technikerstraße 25, 6020 Innsbruck (Österreich)
Fax: (+43) 512-507-2932
E-mail: paul.scheier@uibk.ac.at
Prof. Dr. T. D. Märk
Department of Plasma Physics
Comenius University
84248 Bratislava (Slowakische Republik)
Dipl.-Chem. S. Gohlke, Prof. Dr. M. A. Huels,^[+] Prof. Dr. E. Illenberger
Institut für Chemie – Physikalische und Theoretische Chemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

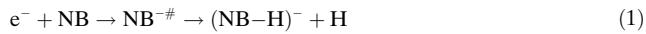
[+] Dauerhafte Anschrift:
Department of Nuclear Medicine and Radiobiology
Faculty of Medicine
University of Sherbrooke
Sherbrooke, QC (Kanada)

[**] Für finanzielle Unterstützung durch FWF, ÖAW und ÖNB (Wien),
das EU-Netzwerk EPIC (Brüssel) und die DFG (Bonn) wird gedankt.

negativ geladenen Zwischenprodukt. Alternativ dazu können sehr langsame Elektronen auch in der Flüssigkeit gelöst werden; in dieser gelösten Form können sie zwar immer noch gentoxische oder mutagene Prozesse auslösen, jedoch auf einer viel größeren Zeitskala ($> \mu\text{s}$). Im Unterschied zu den gelösten Elektronen bewirken Elektronen mit kinetischen Energien bis zu einigen 10 eV sofortige Reaktionen direkt an der DNA oder deren Umgebung. Diese Reaktionen mit dem Zellmaterial könnten bei Strahlenschäden ein wichtiger erster Schritt auf dem Weg zu DNA-Strangbrüchen sein.

Frühere Experimente an Plasmid-DNA zeigten bereits die Fähigkeit von Sekundärelektronen, bei Subionisationsenergien effektiv Einzel- und Doppelstrangbrüche auszulösen,^[4,5] die genaue Abfolge der dabei zugrunde liegenden molekularen Prozesse ist jedoch bisher noch nicht bekannt. Bei einer Elektronenenergie von etwa 10 eV ist die Wahrscheinlichkeit für Strangbrüche besonders groß. Die erhaltene Ausbeutekurve zeigt ein Resonanzverhalten, das auf die Erzeugung angeregter negativ geladener Zwischenprodukte (transitory negative ions, TNI) hindeutet; daher wurde eine dissoziative Elektronenanlagerung (DEA) als der relevante erste molekulare Schritt für Strangbrüche vermutet. Inzwischen wurde durch Ab-initio-Berechnungen der elektronischen Strukturen^[6] und durch Dichtefunktionalrechnungen^[7] untersucht, wie in der DNA durch das Einfangen von Elektronen ein Einzelstrangbruch ausgelöst werden kann.

Die Wechselwirkung freier Elektronen mit isolierten Biomolekülen (DNA-Basen und größeren DNA-Bausteinen) wurde sowohl in dünnen mehrlagigen Schichten im Ultra-hochvakuum (UHV) als auch in der Gasphase studiert. Bei den Oberflächenexperimenten wurde die Intensität der aus dem Film desorbierten negativ geladenen Reaktionsprodukte direkt in Abhängigkeit von der kinetischen Energie der einfallenden Elektronen gemessen.^[8–10] In einigen Fällen war die genaue Charakterisierung der in der Oberfläche verbleibenden Reaktionsprodukte mit Röntgenphotoelektronenspektroskopie möglich.^[11] In den Gasphasenexperimenten wurden die durch (dissoziative) Elektronenanlagerung entstehenden, negativ geladenen (Fragment-)Ionen in Abhängigkeit von der einfallenden Elektronenenergie mit Massenspektrometrie gemessen. In diesen Gasphasenexperimenten zeigte sich, dass alle Nucleobasen (NB) bereits bei Energien unterhalb der Schwelle für elektronische Anregung ($< 3 \text{ eV}$) durch dissoziative Elektronenanlagerung ein Wasserstoffatom gemäß Reaktion (1) abspalten.^[12–15] $\text{NB}^{-\#}$ ist ein kurz-



lebiges Radikal anion (TNI) der entsprechenden Nucleobase, und $(\text{NB}-\text{H})^-$ ist ein Anion mit abgeschlossener Elektronschale, das durch Abspalten eines neutralen Wasserstoffradikals entsteht. Diese Reaktion ist bereits bei Energien unterhalb der Schwelle für elektronische Anregung sehr effektiv und wird energetisch durch die hohe Elektronenaffinität (3–4 eV)^[12] des $(\text{NB}-\text{H})$ -Radikals ermöglicht. Experimente mit partiell deuteriertem Thymin^[16] zeigten deutlich, dass diese Wasserstoffabspaltung ausschließlich an der N1-Position erfolgt (siehe Molekülstruktur in Abbildung 1).

Zusätzlich zu diesem dominanten Prozess bei niedrigen Elektronenenergien (der ausschließlich zur Abspaltung eines Wasserstoffatoms gemäß Reaktion (1) führt) wurden in älteren^[17] und neueren^[18] Gasphasenexperimenten an Nucleobasen im Energiebereich zwischen 5 und 13 eV weitere Resonanzprozesse identifiziert, die zur Erzeugung von Fragment-Anionen führen. In diesem Energiebereich wurde außer der Desorption leichter Fragment-Anionen aus mehrlagigen Filmen auch ein Maximum für Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA beobachtet. Eines der Ionen mit dem intensivsten Signal in diesem Energiebereich ist H^- , das komplementär zu Reaktion (1) gemäß Reaktion (2) gebildet wird.



Hier zeigen wir, dass im Fall von Thymin (T) das Ionensignal von H^- , das durch Reaktion (2) erzeugt wird, zwischen 5 und 13 eV deutliche Resonanzstrukturen aufweist. Durch Verwendung von partiell deuteriertem Thymin (T_D) kann eine direkte Zuordnung dieser Strukturen zur H^- - und D^- -Abspaltung von verschiedenen Positionen des Thyminmoleküls erfolgen. Das H^-/D^- -Ionensignal, das von der Abspaltung an den Kohlenstoffatompositionen herröhrt, ist dem Spektrum für die Energieabhängigkeit von elektroneninduzierten Strangbrüchen der Plasmid-DNA bemerkenswert ähnlich – daher wird die H^- -Abspaltung als möglicher auslösender Schritt für diese Art der DNA-Schädigung betrachtet.

Die Messungen zu den hier vorgestellten Untersuchungen erfolgten mit einem experimentellen Aufbau, bei dem ein Molekularstrahl mit einem Elektronenstrahl gekreuzt wird; Details zu diesem Experiment sind in Lit. [19] zu finden. Der Elektronenstrahl wird in einem hemisphärischen Elektronenmonochromator (Eigenbau) generiert und liefert in den hier besprochenen Experimenten eine Energieauflösung mit einer Halbwertsbreite zwischen 110 und 130 meV bei einem Elektronenstrom von 5 bis 8 nA. Thymin wird in einem temperaturgeregelten Ofen verdampft und über eine Kapillare zum Elektronenmonochromator geleitet.^[14,18] Die Probe wird bis auf 450 K geheizt, um eine genügend hohe Teilchendichte im dabei entstehenden effusiven Molekularstrahl zu erreichen, der dann mit dem Elektronenstrahl gekreuzt wird. Die in der Wechselwirkungsregion gebildeten Anionen werden durch ein schwaches elektrostatisches Feld zum Eingang eines Quadrupolmassenspektrometers extrahiert. Die massenselektierten Anionen werden mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (Channeltron) durch Zählen der Ionenpulse nachgewiesen. Die Intensität der einzelnen massenselektierten Anionen wird in Abhängigkeit von der Elektronenenergie gemessen.

Die Elektronenenergieskala wird über das Cl^- -Signal von CCl_4 , das einen schmalen Peak bei 0 eV aufweist, kalibriert. Darüber hinaus ist über einen zweiten Peak von Cl^- bei 0.8 eV eine Abschätzung des partiellen Wechselwirkungsquerschnitts von H^- aus Thymin möglich. Dabei wird das Ionensignal von H^- aus T bei 5.5 eV mit dem Ionensignal von Cl^- bei 0.8 eV verglichen und über den bekannten Wechselwirkungsquerschnitt von Cl^- aus CCl_4 ^[20] kalibriert. Thymin

und partiell deuteriertes Thymin mit einer Reinheit von 99.5 % wurden bei Sigma-Aldrich gekauft.

Beim partiell deuterierten Thymin (T_D in Abbildung 1) sind alle Wasserstoffatome an den Kohlenstoffatompositionen

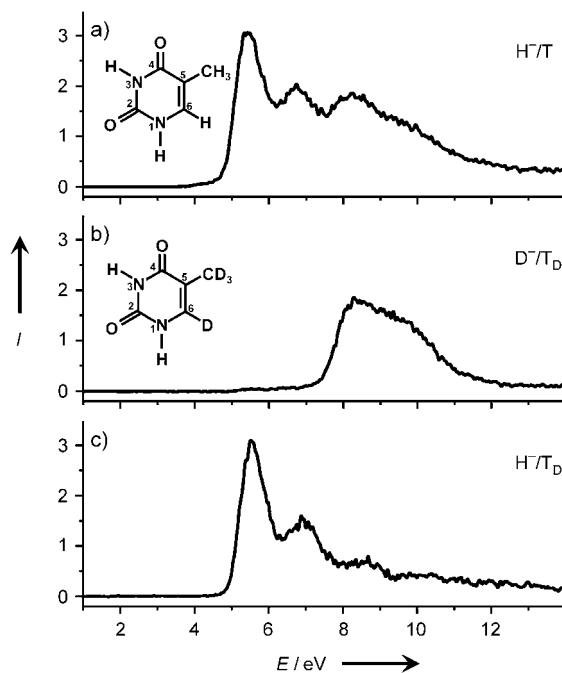


Abbildung 1. Erzeugung von H^- und D^- aus Thymin (T) und partiell deuteriertem Thymin (T_D). a) H^- aus T , b) D^- aus T_D und c) H^- aus T_D in Abhängigkeit von der Elektronenenergie E .

nen durch Deuterium ersetzt. Abbildung 1 zeigt das H^-/D^- -Anionensignal, das durch die dissoziative Elektronenabspaltung an T und T_D entsteht, als Funktion der Elektronenenergie E . Abbildung 1a zeigt die Erzeugung von H^- aus normalem Thymin (H^-/T), 1b von D^- aus partiell deuteriertem Thymin (D^-/T_D) und 1c von H^- aus T_D (H^-/T_D). Das Ionensignal ist in willkürlichen Einheiten angegeben, aber die einzelnen Kurven können miteinander direkt verglichen werden. Mithilfe der oben beschriebenen Methode kann das Ionensignal in einen absoluten Wechselwirkungsquerschnitt umgerechnet werden, was im Fall von H^-/T zu einem Wert von $1.2 \times 10^{-21} \text{ m}^2$ mit einer Unsicherheit von etwa einer Größenordnung bei einer Elektronenenergie von 5.5 eV führt. Das Spektrum von H^-/T ist durch drei deutlich voneinander getrennte Signale bei 5.5, 6.8 und 8.3 eV und einer zusätzlichen Schulter bei 9.3 eV charakterisiert. Man erkennt bereits durch Vergleichen der Spektren 1b und c mit bloßem Auge, dass die beiden Signale bei höheren Elektronenenergien ($> 7.5 \text{ eV}$) ausschließlich von H^- - (oder D^- -) Abspaltung an C-Atomen herrühren, während die beiden Signale bei niedrigen Energien in Abbildung 1a und c durch H^- -Abspaltung an den beiden N-Positionen erzeugt werden. Die Ergebnisse sind sowohl für den Mechanismus dieser Reaktion als auch generell für Reaktionen, die Strangbrüche auslösen können, von großer Bedeutung.

Diese ausgeprägte Selektivität hinsichtlich der Position der abzusetzenden H-Atome ist angesichts der Thermody-

namik und des Mechanismus der Reaktion bemerkenswert: In einer kürzlich erschienenen Studie wurden die Bindungsenergien aller Wasserstoffatome von Thymin berechnet:^[18] $D(N1-H) = 4.4$, $D(N3-H) = 5.8$, $D(C6-H) = 4.9$ und $D(CH_2-H) = 4.5 \text{ eV}$. Mit der Elektronenaffinität des Wasserstoffatoms (0.75 eV)^[21] ergeben sich damit folgende Energieschwellen für die Abspaltung von H^-/D^- an den verschiedenen Positionen von Thymin: $E(N1) = 3.65$, $E(N3) = 5.05$, $E(CH_2) = 3.75$ und $E(C6) = 4.15 \text{ eV}$. Diesen Werten zufolge kann die H^-/D^- -Abspaltung von einem N- oder C-Atom thermodynamisch nicht unterschieden werden und, noch bedeutsamer, bei jeder H^- - und D^- -Abspaltung wird eine Überschussenergie von einigen eV frei.

Aus der Form des Ionensignals in Abhängigkeit von E und unter Berücksichtigung des Reaktionsmechanismus sowie der am Prozess beteiligten elektronischen Zustände wird klar, dass eine DEA für die H^-/D^- -Abspaltung verantwortlich ist. Bei niedrigen Elektronenenergien ($< 3 \text{ eV}$) besetzt das zusätzliche Elektron normalerweise ein leeres Molekülorbital, ohne dabei die Konfiguration der restlichen Elektronen zu beeinflussen (Einteilchen-Shape-Resonanz). Aus der niedrigeren energetischen Reaktion (1) von Nucleobasen resultiert ein Spektrum (Ionensignal in Abhängigkeit von der Elektronenenergie) mit einer interessanten Struktur, die ein schmales Signal bei 1 eV enthält – für diesen Fall wurde kürzlich vorgeschlagen,^[22] dass die Anionen hauptsächlich durch Feshbach-Resonanzen schwingungsangeregter dipolgebundener Zustände, die in den $\sigma^*(N1-H)$ -Valenzzustand koppeln, erzeugt werden.

Die H^- -Abspaltung (Reaktion (2)) findet dagegen in einem Energiebereich statt, in dem die Anregung elektronischer Zustände möglich ist. Dadurch befinden sich in diesem Energiebereich bei den anfänglich erzeugten, kurzlebigen Anionen oft zwei Elektronen in normalerweise unbesetzten Molekülorbitalen. Allerdings sagt eine quantendynamische Streurechnung für Uracil eine Einteilchen-Shape-Resonanz bei 9.1 eV mit stark antibindendem C5-H-Charakter voraus.^[23] Aus den bisher vorliegenden Daten ist es nicht möglich zu entscheiden, ob eine Ein- und/oder Zweiteilchenresonanz bei der Erzeugung von H^- im vorliegenden Energiebereich eine Rolle spielt. Aus der deutlichen Bindungsselektivität kann man ohne weiteres folgern, dass elektronische Zustände im Energiebereich zwischen 5 und 7 eV lokalen antibindenden N-H-Charakter haben und entsprechend jene im Energiebereich zwischen 8 und 12 eV ausgeprägten antibindenden C-H-Charakter. Den vorliegenden Fall bei Thymin erklären wir durch einen direkten elektronischen Zerfall entlang einer abstoßenden Potentialfläche. Die Reaktion ist positionsselektiv hinsichtlich der Elektronenenergie. Wegen des resonanten Verhaltens dieses Prozesses ist es möglich, durch kleine Veränderungen der Elektronenenergie die DEA an unterschiedlichen Stellen im Molekül ablaufen zu lassen.

Eine so ausgeprägte, von der Elektronenenergie abhängige Selektivität in Bezug auf den Ort des Bindungsbruches in einem mehratomigen Molekül ist bemerkenswert. So haben z. B. frühere Experimente an Methanol^[24] gezeigt, dass die Erzeugung von OH^- und OD^- (mit einem Signal bei 10.5 eV) stark von Wasserstoff-Deuterium-Austauschprozessen im an-

geregten intermediären Molekül-Ion bestimmt wird. Unabhängig von der neutralen Ausgangsverbindung (CH_3OH , CH_3OD , CD_3OH , CD_3OD) ergaben sich stets identische Spektren für OH^- und OD^- . Das bedeutet, dass im angeregten intermediären Anion die Wasserstoffatome effektiv ausgetauscht werden.

In DNA ist die Nucleobase über die N1-Position kovalent an den Zucker gebunden, und das Wasserstoffatom an der N3-Position ist Teil einer Wasserstoffbrücke zur komplementären Base. Man kann daher annehmen, dass die in der Gasphase beobachteten Signale bei niedriger Energie (unter 7 eV), die einer Abspaltung von H^- von den Thymin-Stickstoffatomen zugeordnet wurden, in der DNA durch die Bindung an die Nachbarmoleküle entweder völlig fehlen oder so stark beeinflusst werden, dass sie zu anderen Energien verschoben sind.

In Abbildung 2 vergleichen wir die Erzeugung von D^- aus gasförmigem T_D mit dem Signal von H^- -Ionen, die durch Bestrahlung mit Elektronen von niedriger Energie aus einem

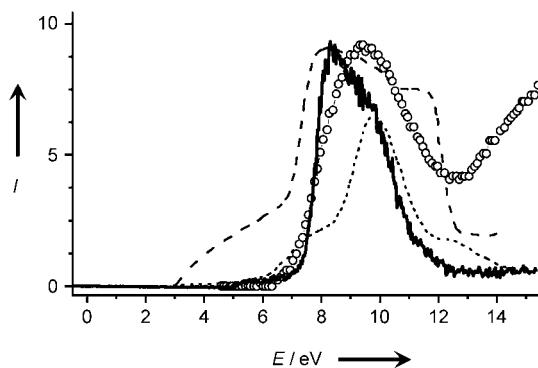


Abbildung 2. —: D⁺-Erzeugung aus gasförmigem T_D, ○: H⁺-Ionen-signal, das aus einem dünnen Thymin-Film bei Elektronenbeschuss de-sorbiert,^[25] —: I-E-Spektren bei Einzelstrangbrüchen (ESB) und: Doppelstrangbrüchen (DSB) von Plasmid-DNA.^[4, 5] Die Intensität der Signale für ESB und DSB wurde willkürlich normiert.

dünnen Thymin-Film an einer reinen Metalloberfläche desorbiert werden.^[25] Weiterhin sind die Spektren für die Energieabhängigkeit von Einzel- und Doppelstrangbrüchen^[4,5] von Plasmid-DNA in dieser Abbildung zu sehen. Es zeigt sich, dass Strangbrüche in einem Energiebereich auftreten, in dem die H⁻-Abspaltung (Reaktion (2)) sehr effektiv ist; dies gilt besonders in jenem Energiebereich, in dem H⁻ von den Kohlenstoffatomen abgespalten wird. Das lässt darauf schließen, dass die Abspaltung von Wasserstoff von den Kohlenstoffatomenpositionen der erste Schritt bei einem DNA-Strangbruch ist. Man sollte aber bedenken, dass für einen Einzelstrangbruch ein Bruch in der Zucker-Phosphat-Einheit notwendig ist, der durch unterschiedliche primäre Prozesse verursacht werden kann. In einer Ab-initio-Strukturrechnung wurde kürzlich aufgezeigt, wie die Anlagerung von niederenergetischen Elektronen an eine Nucleobase schließlich zu einem Bruch der C-O-Bindung in der Zucker-Phosphat-Einheit führen kann.^[6]

Die vorliegenden Experimente ergaben eine bemerkenswerte Bindungsselektivität für die Abspaltung von H^-/D^- von

Thymin abhängig von der gewählten Elektronenenergie. Die Signale, die eindeutig mit der Abspaltung von H^-/D^- von den Kohlenstoffatompositionen korreliert sind, haben eine ähnliche Form wie die Spektren für die Energieabhängigkeit von Einzel- und Doppelstrangbrüchen von Plasmid-DNA.

Eingegangen am 20. August 2004
Online veröffentlicht am 9. Februar 2005

Stichwörter: Anionen · Dissoziative Elektronenanlagerung · DNA-Schäden · Gasphasenreaktionen · Nucleobasen

- [1] L. Sanche, *Mass Spectrom. Rev.* **2003**, *21*, 349.
 - [2] S. Gohlke, E. Illenberger, *Europhys. News* **2002**, *33*, 207.
 - [3] J. A. La Verne, S. M. Pimblott, *Radiat. Res.* **1995**, *141*, 208.
 - [4] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, L. Sanche, *Science* **2000**, *287*, 1658.
 - [5] M. A. Huels, B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, L. Sanche, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4467.
 - [6] R. Barrios, P. Skurski, J. Simons, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7991.
 - [7] X. Li, M. D. Sevilla, L. Sanche, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13668.
 - [8] H. Abdoul-Carime, L. Sanche, *Radiat. Res.* **2001**, *156*, 151.
 - [9] M.-A. Hervé du Penhoat, M. A. Huels, P. Cloutier, J.-P. Jay-Gerin, L. Sanche, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 5755. In diesem Bericht wurden vorläufige Daten zur D^- -Ionenausbeute für T_D gezeigt, die sich jedoch deutlich von jetzt erhaltenen Werten für die D^- -Ausbeute unterscheiden.
 - [10] X. Pan, P. Cloutier, D. Hunting, L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 208102.
 - [11] D. V. Klyachko, M. A. Huels, L. Sanche, *Radiat. Res.* **1999**, *151*, 177.
 - [12] G. Hanel, B. Gstir, S. Denifl, P. Scheier, M. Probst, B. Farizon, M. Farizon, E. Illenberger, T. D. Märk, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 188104.
 - [13] S. Gohlke, H. Abdoul-Carime, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *380*, 595.
 - [14] S. Denifl, S. Ptasińska, M. Cingel, S. Matejcik, P. Scheier, T. D. Märk, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *377*, 74.
 - [15] R. Abouaf, J. Pommier, H. Dunet, *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 397.
 - [16] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 168103.
 - [17] M. A. Huels, I. Hahndorf, E. Illenberger, L. Sanche, *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 1309.
 - [18] S. Denifl, S. Ptasińska, M. Probst, J. Hrusak, P. Scheier, T. D. Märk, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 6562.
 - [19] D. Muigg, G. Denifl, A. Stamatovic, O. Echt, T. D. Märk, *Chem. Phys.* **1998**, *239*, 409.
 - [20] G. A. Gallup, K. Aflatooni, P. D. Burrow, *Chem. Phys.* **2003**, *118*, 2562.
 - [21] *Handbook of Chemistry and Physics*, 78. Aufl. (Hrsg.: D. R. Lide), CRC, Boca Raton, FL, **1997**.
 - [22] A. M. Scheer, K. Aflatooni, G. A. Gallup, P. D. Burrow, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 068102.
 - [23] A. Grandi, F. A. Gianturco, N. Sanna, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 048103.
 - [24] A. Kühn, H.-P. Fenzlaff, E. Illenberger, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 7453.
 - [25] H. Abdoul-Carime, P. Cloutier, L. Sanche, *Radiat. Res.* **2001**, *155*, 625.