

Bindungs- und ortsselektive Abspaltung von H-Atomen aus Nucleobasen, induziert durch Elektronen sehr niedriger Energie (< 3 eV)***Sylwia Ptasinska, Stephan Denifl, Paul Scheier, Eugen Illenberger* und Tilmann D. Märk*

Die Deponierung von Überschussladung auf Thymin (T) und Uracil (U) in der Gasphase durch resonante Anlagerung von Elektronen niedriger Energie (0–3 eV) führt zur Abspaltung von atomarem Wasserstoff, und zwar ausschließlich an den N-Positionen. Durch geeignete Wahl der Elektronenenergie kann diese Bindungselektivität sogar noch selektiv bezüglich der N-Position gemacht werden. Während Elektronen der Energie 1.0 eV ausschließlich eine N1-H-Abspaltung induzieren, bewirken Elektronen der Energie 1.8 eV eine N3-H-Abspaltung. Wir beobachten, dass jeglicher Energie- und Ladungstransfer vollständig blockiert wird, sobald die N-H-Bindung durch N-CH₃ ersetzt wird. Die vorliegenden Ergebnisse haben wichtige Konsequenzen für die Erforschung der initialen molekularen Mechanismen, die zur DNA-Schädigung führen, insbesondere im Hinblick auf die kürzlich gemachten Beobachtungen von Strangbrüchen in plasmidier DNA durch niederenergetische (0–4 eV) Elektronen.^[1]

Die in jüngster Zeit durchgeführten Experimente an den Nucleobasen (NB) Thymin (T), Cytosin (C), Adenin (A) und Guanin (G) haben gezeigt, dass alle Nucleobasen effektiv Elektronen im Bereich unterhalb einer Energie von ca. 3 eV einfangen.^[2–6] Das jeweils dabei erzeugte transiente negative Ion (TNI) dissoziiert anschließend durch Abspaltung eines H-Atoms. Die zugrunde liegende Reaktion (dissoziative Elektronenanlagerung, DEA) kann durch die Gleichung (1) aus-



gedrückt werden. Dabei repräsentiert NB^{·-} das transiente molekulare Anion (TNI) der entsprechenden Nucleobase und (NB–H)⁻ das entsprechende Anion (mit abgeschlossener Elektronenschale), das durch Abspaltung eines neutralen

Wasserstoffradikals entsteht. Die Reaktion verläuft bereits bei Energien unterhalb der Schwelle für elektronische Anregung, sie wird energetisch durch die bemerkenswert hohen Elektronenaffinitäten der (NB–H)-Radikale getrieben. Diese liegt im Bereich zwischen 3 und 4 eV, abhängig vom genauen Ort der Wasserstoffabspaltung,^[2,6] siehe unten. Experimente an teilweise deuteriertem Thymin^[5] haben gezeigt, dass die Wasserstoffabspaltung ausschließlich an den N-Positionen erfolgt, obgleich eine Abspaltung auch von den C-Positionen energetisch möglich ist. Im vorliegenden Beitrag wird mithilfe von methyliertem Thymin und methyliertem Uracil gezeigt, dass bei genauer Einstellung der Elektronenenergie die Abspaltung von Wasserstoff sogar selektiv bezüglich der N1-H- und der N3-H-Position gemacht werden kann. Dieses Ergebnis ist sehr bemerkenswert und z. B. vor dem Hintergrund aktueller Arbeiten zu selektiven Bindungsbrüchen mithilfe von geformten, ultrakurzen Laserpulsen^[7] besonders hervorzuheben.

Daneben hat das hier vorgestellte Ergebnis auch direkte Auswirkungen auf die molekulare Beschreibung von Strahlenschäden in biologischen Systemen, genauer, auf die Schädigung von DNA in lebenden Zellen. Die allgemein akzeptierte Vorstellung geht davon aus, dass der vorrangige biologische Effekt nicht durch die primäre Wechselwirkung der hochenergetischen Quanten mit dem komplexen molekularen Netzwerk einer Zelle verursacht wird, sondern vielmehr durch die Einwirkung sekundärer Spezies, die längs der Ionisationsspur erzeugt werden.^[8] Die Wechselwirkung dieser sekundären Spezies (Ionen, Elektronen, Radikale) mit DNA und ihrer Umgebung kann mutagene, genotoxische und andere, möglicherweise letale Veränderungen der DNA zur Folge haben, z. B. Einzel- und Doppelstrangbrüche.

Von diesen sekundären Spezies sind Elektronen bei weitem die häufigste. Sie werden mit einer initialen Energieverteilung erzeugt, die bis ca. 20 eV reicht.^[9,10] Um die Wirkung von Strahlung auf lebende Zellen verstehen zu können, muss man die Wirkung dieser Elektronen auf die entscheidenden Zellkomponenten wie Wasser und DNA untersuchen. Experimente von Boudaiffa et al.,^[11] bei denen plasmid DNA auf einem Substrat direkt der Wirkung eines Elektronenstrahls definierter und variabler Energie ausgesetzt war, haben gezeigt, dass Elektronen mit Energien unterhalb der Ionisierungsenergie Einzel- und Doppelstrangbrüche verursachen. Jüngst wurde von der gleichen Gruppe (ebenfalls an plasmidier DNA) demonstriert, dass Elektronen bereits im Schwellenbereich des Strahls (nahe 0 eV) Einzelstrangbrüche verursachen. Die Intensität der Strangbrüche in Abhängigkeit von der Elektronenenergie zeigt dabei einen relativ scharfen Peak bei 0.8 eV sowie eine breitere Struktur, deren Mittelpunkt bei 2.2 eV liegt.^[1] Es ist anzumerken, dass der genaue molekulare Mechanismus der Schädigung von DNA durch Elektronen bis dato nicht bekannt ist. Hier untersuchen wir detailliert die Prozesse, die in isoliertem Thymin (T) und Uracil (U) durch langsame Elektronen induziert werden. In diesem Zusammenhang werden auch die methylierten Nucleobasen untersucht.

Die Untersuchungen wurden in einem Kreuzstrahlexperiment durchgeführt, das an anderer Stelle bereits ausführlich beschrieben wurde.^[12] Der Elektronenstrahl wird in einem

[*] Prof. Dr. E. Illenberger
Institut für Chemie – Physikalische und Theoretische Chemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-838-55378
E-mail: iln@chemie.fu-berlin.de

Dr. S. Ptasinska, Dr. S. Denifl, Prof. Dr. P. Scheier,
Prof. Dr. T. D. Märk^[†]
Institut für Ionenphysik und Zentrum für molekulare Biowissenschaften, Universität Innsbruck, Technikerstraße 25, 6020 Innsbruck (Österreich)

[†] Auch Adjunct Professor am Department of Experimental Physics, Comenius University, 84248 Bratislava (Slowakei).

[**] Die vorliegende Arbeit wurde gefördert durch den FWF (Wien), die EU (Brüssel) über das Netzwerk EPIC sowie die DFG (Bonn).

hemisphärischen Monochromator erzeugt, der bei den hier vorgestellten Experimenten mit einer Energieauflösung im Bereich von 60–110 meV bei einer Stromstärke von 5–8 nA betrieben wurde. Die pulverförmigen Proben werden in einem Ofen bei einer Temperatur von 385–400 K verdampft, und durch Ausströmen aus einer Kapillare wird ein (effusiver) Molekularstrahl erzeugt. Die in der Kollisionszone entstehenden, negativ geladenen Ionen werden durch ein schwaches elektrisches Feld in Richtung der Eingangsöffnung des Quadrupol-Massenspektrometers extrahiert und nach Massanalyse mittels Einzelpulszähltechnik nachgewiesen. Die Intensität eines ausgewählten negativen Ions wird anschließend in Abhängigkeit von der Elektronenenergie registriert. Die Eichung der Energieskala erfolgt über den bekannten Standard des Signals Cl^-/CCl_4 nahe 0 eV. Methyliertes Thymin und Uracil mit einer ausgewiesenen Reinheit von 98 % wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Abbildung 1 zeigt die Ionenausbeute (d.h. Wasserstoffabspaltung) von an der N1-Position methyliertem Thymin (m1T) im Vergleich zur entsprechenden Ionenausbeute aus

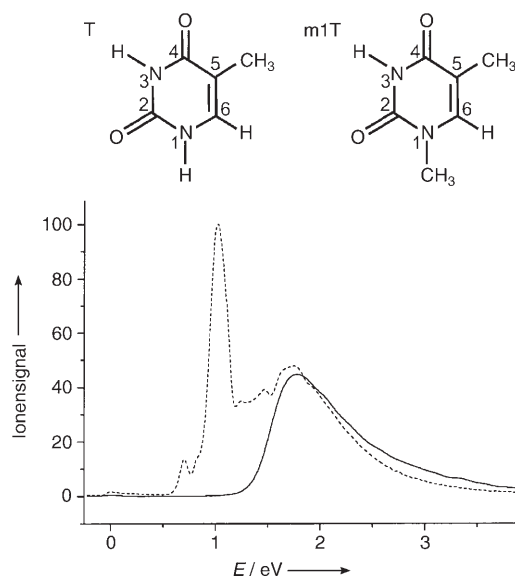


Abbildung 1. Ionenausbeutekurven des Fragment-Ions $(M-H)^-$ (Abspaltung eines neutralen Wasserstoffatoms) von methyliertem Thymin (N1-Position, m1T; —) und Thymin (T; ----); E = Elektronenenergie.

(nicht methyliertem) Thymin (T), jeweils registriert über die Ausbeutekurve des entsprechenden Anions $(M-H)^-$, siehe Gleichung (1). Für die Interpretation dieses Ergebnisses verweisen wir auf die kürzlich durchgeführten Untersuchungen an C-deutertem Thymin.^[5] Dabei konnte gezeigt werden, dass die H-Abspaltung bei niedrigen Energien ausschließlich an den N-Positionen erfolgt. Abbildung 1 zeigt unmittelbar, dass bei m1T unterhalb von 1.4 eV keinerlei H-Abspaltung zu beobachten ist, weshalb wir das breitere Signal mit einem Maximum bei 1.8 eV der Wasserstoffabspaltung von der N3-Position zuordnen. Der Verlust von Wasserstoff ist damit nicht nur ausschließlich auf die N-Bindungen beschränkt, er kann zudem durch genaue Einstellung der Elektronenenergie auch ortsspezifisch gemacht werden.

Das N3-methylierte Uracil (m3U) zeigt ein komplementäres Verhalten (Abbildung 2): Hier erfolgt die Wasserstoffabspaltung hauptsächlich innerhalb des vergleichsweise scharfen Peaks bei 1.0 eV, den wir folgerichtig der Abspaltung

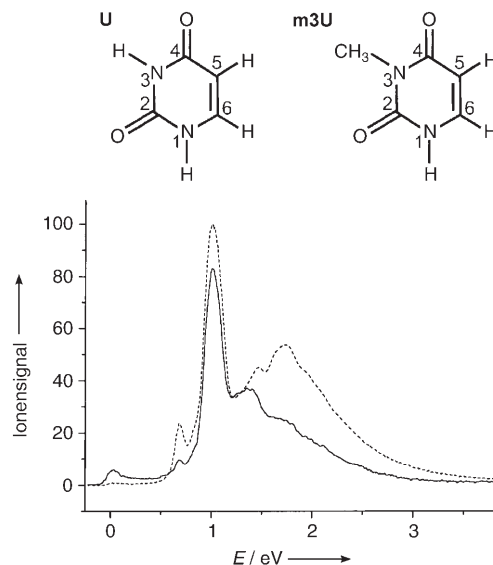


Abbildung 2. Ionenausbeutekurven des Fragment-Ions $(M-H)^-$ (Abspaltung eines neutralen Wasserstoffatoms) von methyliertem Uracil (N3-Position, m3U; —) und Uracil (U; ----); E = Elektronenenergie.

an der N1-Position zuzuordnen. Die relative Form der Ionenausbeute $(M-H)^-$ aus T und U ist im Übrigen de facto identisch (was beim Vergleich von Abbildung 1 und Abbildung 2 unmittelbar ersichtlich ist). Das $(M-H)^-$ -Signal für m3U (N1-H-Abspaltung) weist noch eine gewisse Intensität bei Energien oberhalb von 1.4 eV auf, das $(M-H)^-$ -Signal für m1T (N3-H-Abspaltung) verschwindet dagegen unterhalb von 1.4 eV völlig. Diese vollständige Selektivität resultiert aus den energetischen Verhältnissen, die nachfolgend kurz illustriert werden sollen.

Die energetische Schwelle der DEA-Reaktion (1) kann durch Gleichung (2) ausgedrückt werden, wobei D für die

$$E_0 = D - EA(M-H) \quad (2)$$

entsprechende Bindungsenergie (N-H/C-H) steht und $EA(M-H)$ für die Elektronenaffinität des durch die Wasserstoffabspaltung am jeweiligen Ort erzeugten Radikals. Die Schwelle E_0 bezieht sich auf eine Reaktion bei 0 K. Die experimentell beobachtete Schwelle (die so genannte Auftrettsenergie des Fragment-Ions $(M-H)^-$) unterscheidet sich im Allgemeinen von E_0 , im Wesentlichen verursacht durch zwei gegenläufige Effekte: 1) Das transiente negative Ion wird über einen Franck-Condon-Übergang erzeugt, mit der Tendenz, die Auftrettsenergie auf Werte über E_0 zu verschieben; 2) die interne Energie des Zielmoleküls ermöglicht Übergänge aus angeregten (Schwingungs-)Zuständen, was zu einer Absenkung der Auftrettsenergie führt.

Da bisher keine experimentell ermittelten Werte für die verschiedenen C-H- oder N-H-Bindungsenergien in T oder U verfügbar sind, beziehen wir uns auf kürzlich durchgeführte Ab-initio-Berechnungen. Mit der G2MP2-Methode wurden

die folgenden Werte für Thymin ermittelt:^[6] $D(\text{N1-H}) = 4.4 \text{ eV/EA}(\text{T-H}) = 3.5 \text{ eV}$; $D(\text{N3-H}) = 5.8 \text{ eV/EA}(\text{T-H}) = 4.5 \text{ eV}$; $D(\text{CH}_2\text{-H}) = 4.5 \text{ eV/EA}(\text{T-H}) = 2.9 \text{ eV}$; $D(\text{C6-H}) = 4.9 \text{ eV/EA}(\text{T-H}) = 2.7 \text{ eV}$. Daraus ergeben sich die folgenden Energieschwellen: $E_0(\text{N1-H}) = 0.9 \text{ eV}$, $E_0(\text{N3-H}) = 1.3 \text{ eV}$, $E_0(\text{CH}_2\text{-H}) = 1.6 \text{ eV}$ und $E_0(\text{C6-H}) = 2.2 \text{ eV}$. Für U ergeben sich folgende Werte (ebenfalls mit der G2MP2-Methode ermittelt^[2]): $D(\text{N1-H}) = 4.4 \text{ eV/EA}(\text{U-H}) = 3.6 \text{ eV}$; $D(\text{N3-H}) = 5.4 \text{ eV/EA}(\text{U-H}) = 4.0 \text{ eV}$; $D(\text{C5-H}) = 5.2 \text{ eV/EA}(\text{U-H}) = 2.5 \text{ eV}$; $D(\text{C6-H}) = 5.0 \text{ eV/EA}(\text{U-H}) = 2.8 \text{ eV}$ mit den entsprechenden Energieschwellen: $E_0(\text{N1-H}) = 0.8 \text{ eV}$, $E_0(\text{N3-H}) = 1.4 \text{ eV}$, $E_0(\text{C5-H}) = 2.7 \text{ eV}$ und $E_0(\text{C6-H}) = 2.2 \text{ eV}$.

Daraus lassen sich die folgenden Schlüsse ziehen:

- Obwohl die Wasserstoffabspaltung an den C-Atomen ab 1.6 eV energetisch möglich ist, wird sie im gesamten Energiebereich der Resonanz (der sich bis über 3 eV erstreckt) nicht beobachtet.
- Bei Energien unterhalb von 1.4 eV erfolgt die Wasserstoffabspaltung ausschließlich an der N1-Position, da der konkurrierende Reaktionspfad (Abspaltung an der N3-Position) energetisch erst ab 1.4 eV möglich wird.
- Bei Energien über 1.4 eV erfolgt die Abspaltung von Wasserstoff sowohl an der N1- als auch der N3-Position.

Die Tatsache, dass der N1-H-Verlust vorzugsweise bei niedriger Energie (1.0 eV) erfolgt (verglichen mit dem Energiebereich oberhalb von 1.4 eV), ist vermutlich in zwei unterschiedlichen Mechanismen begründet, die zu Reaktion (1) beitragen. Ausgehend von dem bemerkenswert hohen Dipolmoment von Uracil (ca. 4.5 D) wurde kürzlich ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem ein dipolgebundener Zustand als Eintrittspforte für die dissoziative Elektronenanlagerung fungiert.^[13] Unterstützt durch Ab-initio-Rechnungen wurde der scharfe Peak bei 1.0 eV einer so genannten „dipolgebundenen Vibrations-Feshbach-Resonanz“ zugeordnet, in der drei Quanten der N1-H-Streckschwingung angeregt sind und die über eine vermiedene Kreuzung mit dem repulsiven $\sigma^*(\text{N1-H})$ -Valenzzustand koppelt. Die breitere Struktur kann dann einer π_2^* -Shape-Resonanz zugeordnet werden,^[14] die ihrerseits über vibronische Kopplung mit den repulsiven σ^* -Zuständen zur Dissoziation führt. Die Reaktion ist effektiver, wenn sie über den initialen dipolgebundenen Zustand eingeleitet wird (im Vergleich zur initialen π_2^* -Resonanz), was letztlich den dominierenden Peak bei 1.0 eV verursacht.

Die Beobachtung, dass beim Austausch von N1-H gegen N1-CH₃ keine Abspaltung von CH₃ erfolgt, hat wesentliche Konsequenzen für die molekulare Beschreibung von Strangbrüchen durch niederenergetische Elektronen. In einer kürzlich durchgeführten theoretischen Untersuchung^[15] (modelliert an einem DNA-Ausschnitt aus Cytosin, der Zuckereinheit und der neutralisierten Phosphatgruppe) wurde eine energetisch niedrig verlaufende anionische Kurve berechnet, die den initialen π^* -Anionen Zustand der Nucleobase mit einem σ^* -Zustand des Zucker-Phosphat-Rückgrates verbindet. Damit könnten Elektronen, die durch eine DNA-Base eingefangen werden, auf das DNA-Rückgrat übertragen werden und schließlich einen C-O-Bindungsbruch zwischen

der Zucker- und Phosphateinheit verursachen. In DNA ist allerdings die N1-Position von Thymin mit der Zuckereinheit verbunden, und den hier erzielten Ergebnisse zufolge findet kein Ladungs- oder Energietransfer über eine N1-C-Bindung statt. Dies wird zusätzlich durch Experimente an Thymidin (Thymin verbunden mit einer Zuckereinheit) gestützt,^[16] die definitiv zeigen, dass ein initialer Elektroneneinfang durch die Thymin-Einheit nicht mit einem Elektronentransfer zur Zuckereinheit verbunden ist.

Wir kommen damit zu der Schlussfolgerung, dass die direkte Migration von Exzessladungen von den π^* -Anionen der Nucleobasen zum DNA-Rückgrat als Mechanismus für DNA-Strangbrüche ausgeschlossen werden kann. Stattdessen können Elektronen im Energiebereich um 2 eV eine N3-H-Abspaltung verursachen, die in einem biologischen Medium zu weiteren Reaktionen führen kann, die schließlich in einem Strangbruch resultieren. Außerdem zeigen Experimente an Desoxyribose sehr effektive DEA-Reaktionen bei niedrigen Energien.^[17] Sollten Reaktionen dieser Art auch an Desoxyribose ablaufen, die in das DNA-Netzwerk eingebunden ist, wird ihnen mit Sicherheit eine erhebliche Bedeutung für Strangbrüche zukommen.

Eingegangen am 13. Juni 2005

Online veröffentlicht am 5. Oktober 2005

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

- [1] F. Martin, P. D. Burrow, Z. Cai, P. Cloutier, D. Hunting, L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 068101.
- [2] G. Hanel, S. Denifl, P. Scheier, M. Probst, B. Farizon, M. Farizon, E. Illenberger, T. D. Märk, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 188104.
- [3] S. Denifl, S. Ptasińska, M. Cingel, S. Matejčík, P. Scheier, T. D. Märk, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *377*, 74.
- [4] R. Abouaf, J. Pommier, H. Dunet, *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 397.
- [5] S. Gohlke, H. Abdoul-Carime, E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 168103.
- [6] S. Denifl, S. Ptasińska, M. Probst, J. Hrusak, P. Scheier, T. D. Märk, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 6562.
- [7] C. Daniel, J. Full, L. Gonzales, C. Lupulescu, J. Manz, A. Merli, S. Vajda, L. Woeste, *Science* **2003**, *299*, 536.
- [8] C. von Sonntag, *The Chemical Basis for Radiobiology*, Taylor and Francis, London, **1987**.
- [9] J. F. Ward in *Advances in Radiobiology 5* (Hrsg.: J. T. Lett, H. Adler), Academic Press, New York, **1977**, S. 181.
- [10] J. A. La Verne, S. M. Pimblott, *Radiat. Res.* **1995**, *141*, 208.
- [11] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, L. Sanche, *Science* **2000**, *287*, 1658.
- [12] D. Muigg, G. Denifl, A. Stamatovic, T. D. Märk, *Chem. Phys.* **1998**, *239*, 409.
- [13] A. M. Scheer, K. Aflatooni, G. A. Gallup, P. D. Burrow, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 068102.
- [14] K. Aflatooni, G. A. Gallup, P. D. Burrow, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 6205.
- [15] J. Berdys, I. Anusiewicz, O. Skurski, J. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6441.
- [16] S. Ptasińska, S. Denifl, P. Scheier, E. Illenberger, T. D. Märk, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [17] S. Ptasińska, S. Denifl, P. Scheier, T. D. Märk, *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 8505.