

# Einfluss funktioneller Gruppen auf den ortselektiven Bindungsbruch von Adenin, induziert durch Anlagerung niederenergetischer Elektronen\*\*

Stephan Denifl, Philipp Sulzer, Dieter Huber, Fabio Zappa, Michael Probst, Tilmann D. Märk, Paul Scheier,\* Natcha Injan, Jumras Limtrakul, Robert Abouaf und Henri Dunet

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien zur dissoziativen Elektronenanlagerung (DEA) an isolierte Biomoleküle in der Gasphase durchgeführt.<sup>[1]</sup> Auslöser dieser Untersuchungen war die Entdeckung, dass Einzel- und Doppelstrangbrüche in Plasmid-DNA durch Elektronenbeschuss mit Energien unter 15 eV induziert werden.<sup>[2]</sup> Diese Art der DNA-Schädigung wurde mit der Bildung und dem Zerfall von kurzlebigen Molekülanionen erklärt, die im Bereich der DNA-Basen lokalisiert sind.<sup>[1]</sup> Im Fall isolierter Nucleobasen ist die am häufigsten gebildete Spezies das dehydrogenierte Molekülanion, das eine abgeschlossene Elektronenschale aufweist [Gl. (1)]. Dabei ist  $M^{-*}$  das transiente Molekülanion, das durch die Elektronenanlagerung gebildet wird.



Bei allen bisher untersuchten Nucleobasen ist Reaktion (1) nur bei Elektronenenergien unterhalb 3 eV effektiv. Das Ionensignal als Funktion der Elektronenenergie zeigt dabei ein charakteristisches Spektrum mit einigen schmalen überlappenden Resonanzen und einer oder mehreren nachfolgenden breiten Resonanzen.<sup>[3–6]</sup> Experimente mit partiell deuteriertem Thymin belegten, dass die Wasserstoffabspaltung in Reaktion (1) für Thymin (T) ausschließlich an den Stickstoffatomen stattfindet. Durch anschließende Messungen mit partiell methylierten Pyrimidinbasen<sup>[7,8]</sup> konnten die schmalen Resonanzen der H-Abspaltung von der N1-Stelle zugeordnet werden. Somit zeigten diese DEA-Experimente für T und Uracil (U) eine bemerkenswert bindings- und

ortsselektive H-Abspaltung. Eine vergleichbare Bindungsbruchselektivität wurde in der Zwischenzeit auch bei der Bildung von  $H^{-}$  nach dissoziativer Elektronenanlagerung an  $T^{[9,10]}$  und  $U^{[9,10]}$  sowie auch an einfache organische Moleküle wie Essigsäure<sup>[11]</sup> und D-Ribose beobachtet.<sup>[12]</sup> Diese DEA-Experimente zeigten eine Möglichkeit auf, chemische Reaktionen durch Wahl der Elektronenenergie zu steuern. Eine solche Reaktionssteuerung wurde bisher nur durch inelastisches Tunneln von Elektronen in Rastertunnelmikroskopen<sup>[13]</sup> und in aufwendigen Laser-Experimenten erreicht.<sup>[14]</sup>

Eine ungeklärte Frage blieb, ob diese Steuerung von chemischen Reaktionen durch DEA spezifisch für die oben genannten Moleküle ist, oder ob es sich um ein allgemeines Phänomen handelt, das damit auch bei anderen Klassen von Biomolekülen anzutreffen wäre. Um Aufschluss zu erhalten, haben wir die relativen Elektronenanlagerungsquerschnitte der  $(M-H)^{-}$ -Ionensignale mehrerer Purinderivate untersucht und quantenchemische Rechnungen angestellt. Eingesetzt wurden partiell markierte Derivate des Adenins (Ad), deren Molekülstrukturen in den Abbildungen 1 und 2 gezeigt sind.

Die hier beschriebenen Messungen wurden mit zwei Apparaturen in Innsbruck und Orsay ausgeführt. Die Apparatur in Orsay besteht aus einem Elektronenspektrometer mit zwei hemisphärischen Energieanalysatoren, von denen einer zur Energieselektion des Elektronenstrahls dient (Energieauflösung 25–60 meV) und der andere, in Kombination mit einem Flugzeitmassenspektrometer, als Analysator genutzt wird.<sup>[16]</sup> Die Apparatur in Innsbruck besteht aus einem hemisphärischen Elektronenmonochromator (Auflösung 60–100 meV) mit einem Quadrupolmassenfilter.<sup>[3,4]</sup> Ein effusiver Strahl neutraler Moleküle wird durch Aufheizen der kommerziell bezogenen Proben in einem Ofen erzeugt (Temperatur je nach Molekül zwischen 115 und 190 °C). Die Energieskala wird gegen die 0-eV-Resonanz von  $SF_6^{-}/SF_6$  oder  $Cl^{-}/CCl_4$  kalibriert.

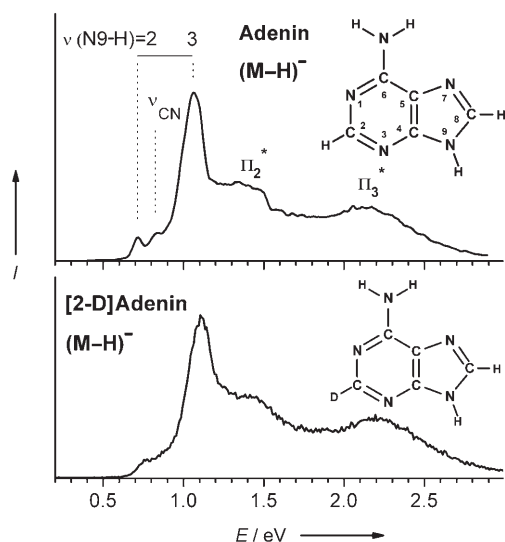
Das DEA-Spektrum des dehydrogenierten Ad-Anions  $(M-H)^{-}$ , das mit einer Elektronenenergieauflösung von ca. 60 meV in Orsay gemessen wurde, ist in Abbildung 1 (oben) gezeigt. Diese Messung ist in guter Übereinstimmung mit der früheren Messung<sup>[17]</sup> des gleichen Anions an der Apparatur in Innsbruck. Dies lässt den Schluss zu, dass die Messungen beider Apparaturen von vergleichbarer Qualität sind. Das DEA-Spektrum zeigt schmale Resonanzen bei 0.72, 0.84 und 1.07 eV (jeweils  $\pm 0.07$  eV) und zwei breite Resonanzen bei 1.4 und 2.2 eV. Abbildung 1 (unten) zeigt außerdem das Signal von  $(M-H)^{-}$  für C2-deuteriertes Adenin ([2-D]Ad)

[\*] Dr. S. Denifl, P. Sulzer, D. Huber, Dr. F. Zappa, Prof. M. Probst, Prof. T. D. Märk, Prof. P. Scheier

Institut für Ionenphysik und Angewandte Physik  
Leopold-Franzens-Universität Innsbruck und  
Center for Molecular Biosciences Innsbruck  
Technikerstraße 25, 6020 Innsbruck (Österreich)  
Fax: (+43) 512-507-2932  
E-Mail: paul.scheier@uibk.ac.at

N. Injan, Prof. J. Limtrakul  
Department of Chemistry and Center of Nanotechnology  
Kasetsart University  
Bangkok 10900 (Thailand)  
Prof. R. Abouaf, H. Dunet  
Laboratoire des Collisions Atomiques et Moléculaires (UMR 8625)  
Bâtiment 351, Université Paris-Sud  
91405 Orsay Cedex (Frankreich)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von folgenden Institutionen gefördert: FWF (Wien), Europäische Kommission (EIPAM, COST P9 und ITS-LEIF) sowie TRF, UDC und NANOTEC (Thailand).



**Abbildung 1.** Ionensignal des dehydrogenierten Molekülanions  $(M-H)^-$ , das bei DEA an Adenin (oben; gemessen in Orsay) und [2-D]Adenin (unten; gemessen in Innsbruck) gemessen wird. Die Energieniveaus der Schwingungsmoden der N9-H-Streckschwingung und der C-N-Ringoszillation sind für Ad eingezeichnet. Die gezeigte kanonische Form der Molekülstruktur von Ad gilt als das stabilste Tautomer in der Gasphase.<sup>[15]</sup>

bei einer Elektronenenergieauflösung von ca. 80 meV. Für beide Moleküle ist das DEA-Spektrum nahezu identisch; einzig die ersten beiden Resonanzen im Spektrum von [2-D]Ad sind kaum zu erkennen, was der schlechteren Energieauflösung zugeschrieben wird. Aus dem Vergleich der beiden Spektren kann man schließen, dass nicht das H-Atom an C2 abgespalten wird, da dieses im [2-D]Ad durch ein Deuterium ersetzt ist und keine Bildung von  $(M-D)^-$  beobachtet wurde.

Alle untersuchten Purine haben eine negative Elektronenaffinität (EA). Die Bindungsenergie  $D$  für die Bindung der H-Atome an Ad und die Energieschwelle  $E_{DEA}$  der Reaktion (1) sind mit der quantenchemischen Methode G2-(MP2)<sup>[18]</sup> für jede H-Bindungsstelle berechnet worden. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Genauigkeit  $\pm 0.2$  eV). Gute Übereinstimmung wird mit früheren DFT-Studien von Evangelista et al.<sup>[19]</sup> erzielt (max. Abweichung 0.02 eV), während zu den Werten von Zierhut et al.<sup>[20]</sup> eine Differenz von 0.35 eV beobachtet wird. Laut Tabelle 1 ist das H-Atom an der N9-Stelle am schwächsten

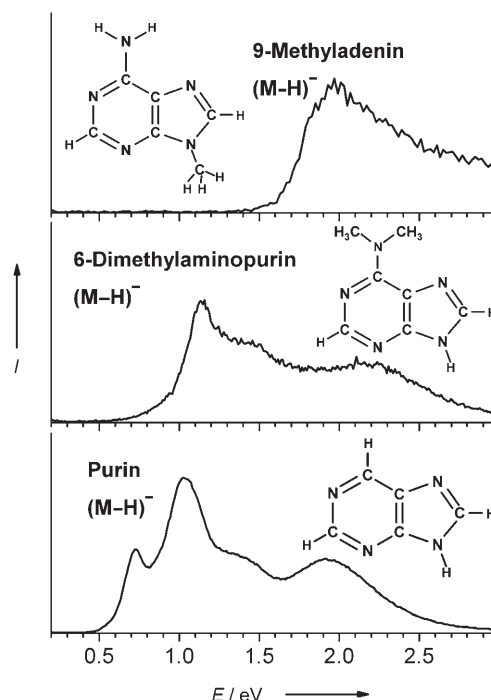
**Tabelle 1:** Bindungsenergien  $D$  der H-Atome in neutralem Adenin und Energien  $E_{DEA}$ , die für die Reaktion  $Ad + e \rightarrow (Ad-H)^- + H$  aufgewendet werden müssen.<sup>[a]</sup>

H-Abspaltung von	$D$	$E_{DEA}$
C2	4.74	3.63
N6	4.69	1.72
C8	5.06	2.53
N9	4.38	0.94

[a] Berechnet mit der G2(MP2)-Methode. Die angegebenen Werte sind in eV und enthalten die elektronische Energie und die Nullpunktsschwingungsenergie.

gebunden. Im DEA-Experiment ist der Energieaufwand für die H-Abspaltung an dieser Stelle ungefähr halb so groß wie an der N6-Position. Die Differenz von  $D$  und  $E_{DEA}$  ergibt die EA von  $(M-H)^-$ . Beispielsweise beträgt die EA von  $(M-H)^-$  nach H-Abspaltung an der N9-Stelle 3.44 eV.

Anhand der Rechnungen kann man die schmalen Resonanzen unterhalb 1.07 eV in Abbildung 1 ausschließlich der H-Abspaltung von der N9-Stelle zuschreiben. Experimentell lässt sich dies durch Messung des  $(M-H)^-$ -Ions von 9-Methyladenin (9-mAd) überprüfen, dessen N9-Stelle durch eine Methylgruppe blockiert ist. Tatsächlich tritt ein  $(M-H)^-$ -Ionsignal für 9-mAd erst bei 1.4 eV auf (Abbildung 2, oben);



**Abbildung 2.** Ionensignal des dehydrogenierten Molekülanions  $(M-H)^-$ , das bei DEA an 9-Methyladenin (oben), 6-Dimethylaminopurin (Mitte) und Purin (unten) gebildet wird.

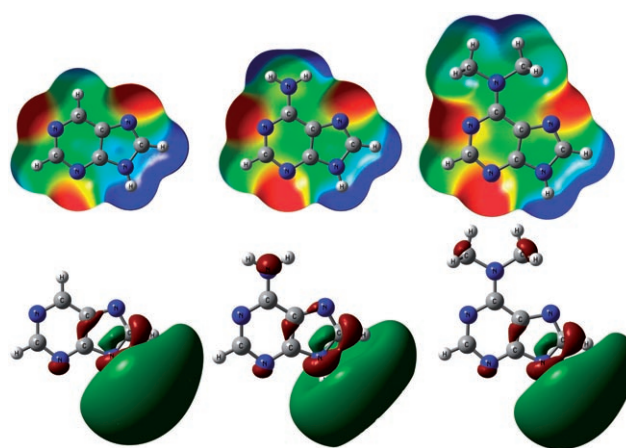
dieses lässt sich – unter Berücksichtigung der in Tabelle 1 angegebenen Werte – einer H-Abspaltung von der  $NH_2$ -Gruppe an der C6-Position zuordnen. Diese Zuordnung wiederum kann durch eine Messung mit 6-Dimethylaminopurin (6-dimAd) überprüft werden, bei dem die  $NH_2$ -Gruppe von Adenin durch eine  $N(CH_3)_2$ -Gruppe ersetzt ist. Überraschenderweise zeigt das Ionensignal von  $(M-H)^-$  (Abbildung 2, Mitte) nicht nur die erwarteten schmalen Resonanzen unterhalb 1.07 eV (die durch H-Abspaltung an der „offenen“ N9-Stelle entstehen), sondern auch Resonanzen bei höheren Energien, die laut Rechnungen der H-Abspaltung von der  $NH_2$ -Gruppe zuzuordnen wären. Für 3-Methyluracil<sup>[7,8]</sup> wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet, der mit dem Auftreten von Feshbach-Resonanzen durch Anregung höherer Schwingungszustände erklärt wurde. Eine analoge Situation

könnte im Fall von 6-dimAd zu den Ionensignalen jenseits 1.07 eV führen.

Weiter gilt festzuhalten, dass die ersten zwei schmalen Resonanzen bei 0.72 eV und 0.84 eV im (M–H)<sup>–</sup>-Ionensignal von Ad (Abbildung 1) bei 6-dimAd verschwunden sind und außerdem die Resonanz bei 1.07 eV deutlich weniger intensiv ist. Ähnliche Unterschiede sind auch zum Purin (Pu) festzustellen (Abbildung 2, unten), dessen höherenergetische Resonanzen aber wiederum gegenüber denen von Ad verschoben sind.

Ähnlich wie für Uracil und Thymin resultiert also bei der dissoziativen Elektronenanlagerung an Adenin ein (M–H)<sup>–</sup>-Ionensignal mit schmalen Resonanzen, das man der H-Abspaltung von der N9-Stelle zuordnen kann (im Fall von U und T spaltet das H-Atom von der N1-Stelle ab). Daher vermuten wir einen ähnlichen Bildungsmechanismus, wie ihn Burrow et al.<sup>[8]</sup> bei T und U vorgeschlagen haben, demzufolge die beobachteten Feshbach-Schwingungsstrukturen durch eine verbotene Kurvenkreuzung der Potentialkurve des niedrigsten  $\sigma^*$ -Zustandes mit der eines dipolgebundenen Zustands entstehen. Nach unseren Berechnungen beträgt das Dipolmoment für Ad 2.36 D. Daher kann man die Peaks bei 0.72 eV und 1.07 eV Feshbach-Resonanzen mit Schwingungszuständen  $v=2$  und  $v=3$  der N9-H-Schwingung zuordnen (siehe Abbildung 1). Dabei lässt sich die H-Abspaltung natürlich nicht als isolierter zweiatomiger Prozess ansehen, und wir interpretieren daher den Peak bei 0.84 eV als Feshbach-Resonanz infolge einer Kombination der N-H-Schwingung ( $v=2$ ) mit einer zusätzlichen Anregung der C–N-Streckschwingung der Ringatome (siehe Abbildung 1). Eine gute Übereinstimmung besteht auch zwischen den hier beobachteten breiten Resonanzen bei 1.4 eV und 2.2 eV und den beiden  $\pi_2^*$ - und  $\pi_3^*$ -Resonanzen, die durch Elektronentransmissionsspektroskopie<sup>[21]</sup> bei 1.36 eV und 2.17 eV gefunden wurden. In diesem Fall prädissoziieren die  $\pi^*$ -Resonanzen durch Schwingungskopplung über höherenergetische  $\sigma^*$ -Resonanzen.

Bemerkenswerterweise erhält man unterschiedliche (M–H)<sup>–</sup>-Spektren für Purinderivate, die sich durch die funktionelle Gruppe an der C6-Stelle unterscheiden, obwohl die H-Abspaltung nur an der N9-Stelle stattfindet. Berechnungen zeigen, dass sich das Dipolmoment von Pu über Ad zu 6-dimAd von 3.66 D auf 2.19 D verkleinert und dass sich außerdem der Dipolmomentvektor aus der Achse in Richtung der N9-H-Bindung dreht. Dies führt offensichtlich zu einer Änderung des elektrischen Feldes im Bereich der N9-H-Bindung. Aufschluss darüber kann die Betrachtung der elektrostatischen Potentiale (ESPs) der Moleküle geben. Beim Purin befindet sich der einzige Bereich mit stark positivem ESP nahe der N9-H-Position (erstreckt sich aber auch zur benachbarten C8-H-Stelle), während beim Ad und 6-dimAd eine zweite Region mit positivem ESP im Bereich der NH<sub>2</sub>- bzw. N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Gruppen auftritt (Abbildung 3). Da Regionen mit positivem ESP elektronenanziehend wirken, ist zu erwarten, dass das ESP ändernde funktionelle Gruppen den DEA-Prozess beeinflussen. Eine Betrachtung der niedrigsten virtuellen  $\sigma^*$ -Molekülorbitale der neutralen Moleküle, die bei der Bildung des transienten Anions besetzt werden, bestätigt diese Vermutung (Abbildung 3). Man kann eindeutig sehen,



**Abbildung 3.** Elektrostatisches Potential (obere Zeile) für Purin (links), Adenin (Mitte) und 6-Dimethylaminopurin (rechts). Bereiche mit positivem ESP sind in Blau und solche mit negativem ESP in Rot dargestellt. In der unteren Zeile sind die Isoflächen der niedrigsten virtuellen  $\sigma^*$ -Molekülorbitale gezeigt (B3LYP/aug-cc-pVTZ-Rechnungen).

dass sich beim Purin keine Wellenfunktionsdichte im Bereich der C6–H-Bindung befindet – ganz im Gegensatz zur C6–NH<sub>2</sub>-Region beim Ad und zur C6–N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Region beim 6-dimAd. Bemerkenswerterweise hat bei jedem der untersuchten Moleküle das niedrigste Paar der virtuellen  $\sigma^*$ -MOs (das zweite ist mit dem ersten durch Symmetriebruch und ein umgekehrtes Vorzeichen der Wellenfunktion verknüpft und wird nicht gezeigt) Knoten, die sich mit der N9–H-Bindung überkreuzen. Dies gibt, unabhängig von der Energie, einen zweiten Hinweis auf die Stelle des Bindungsbruchs. Die nächsthöheren virtuellen  $\sigma^*$ -MOs erstrecken sich in Übereinstimmung mit dem ESP auch über die C8–H-Stelle. ESP und niedrigstes virtuelles  $\sigma^*$ -MO von 9-mAd ähneln denen von Ad. Die genäherten Energien der Molekülorbitale unterscheiden sich nur um 0.05 eV. Da auch das berechnete Dipolmoment von Ad und 9-mAd ähnlich ist (2.37 D bzw. 2.55 D), erklärt dies die große Ähnlichkeit der Elektronen-anlagerungsquerschnitte der beiden Moleküle.

Zusammenfassend haben wir die dissoziative Elektronen-anlagerung an Adenin und einige Purinderivate untersucht. Ein Wechsel des Substituenten an der C6-Stelle führt unterhalb der Elektronenenergie von 1.4 eV zu einer deutlichen Änderung der Bandenstrukturen der Anionenausbeutekurve des dehydrogenierten Molekülanions (M–H)<sup>–</sup>, obwohl die H-Abspaltung ausschließlich an der gegenüberliegenden N9-Stelle stattfindet. Qualitative quantenchemische Rechnungen belegen den Einfluss der funktionellen Gruppen auf das elektrostatische Potential. Dies wiederum wirkt sich auf die bindungsschwächenden  $\sigma^*$ -MOs im Bereich der N9–H-Bindung aus, was letztlich die unterschiedlichen DEA-Spektren der Moleküle bedingt.

Eingegangen am 3. Januar 2007,  
veränderte Fassung am 6. März 2007  
Online veröffentlicht am 1. Juni 2007

**Stichwörter:** DNA-Läsionen · Elektronenanlagerung · Massenspektrometrie · Nucleobasen · Purin

- [1] P. Swiderek, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4160; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4056, zit. Lit.
- [2] B. Boudaïffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, L. Sanche, *Science* **2000**, *287*, 1658.
- [3] S. Denifl, S. Ptasinska, M. Cingel, S. Matejcik, P. Scheier, T. D. Märk, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *377*, 74.
- [4] 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.
- [5] H. Abdoul-Carime, J. Langer, M. A. Huels, E. Illenberger, *Eur. Phys. J. D* **2005**, *35*, 399.
- [6] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 168103.
- [7] S. Ptasinska, S. Denifl, P. Scheier, E. Illenberger, T. D. Märk, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7101; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6941–6943; .
- [8] P. D. Burrow, G. A. Gallup, A. M. Scheer, S. Denifl, S. Ptasinska, T. D. Märk, P. Scheier, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 124310.
- [9] S. Ptasinska, S. Denifl, V. Grill, T. D. Märk, P. Scheier, S. Gohlke, M. A. Huels, E. Illenberger, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1673; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1647.
- [10] S. Ptasinska, S. Denifl, V. Grill, T. D. Märk, E. Illenberger, P. Scheier, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 093201.
- [11] V. S. Prabhudesai, A. H. Kelkar, D. Nandi, E. Krishnakumar, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 143202.
- [12] I. Bald, J. Kopyra, E. Illenberger, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4969; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4851–4855; .
- [13] S. W. Hla, L. Bartels, G. Meyer, K. H. Rieder, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 2777.
- [14] H. Rabitz, R. de Vivie-Riedle, M. Motzkus, K. Kompa, *Science* **2000**, *288*, 824.
- [15] M. Hanus, M. Kabelac, J. Rejnek, F. Ryjacek, P. Hobza, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2087.
- [16] R. Abouaf, H. Dunet, *Eur. Phys. J. D* **2005**, *35*, 405.
- [17] D. Huber, M. Beikircher, S. Denifl, F. Zappa, S. Matejcik, A. Bacher, V. Grill, T. D. Märk, P. Scheier, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 084304.
- [18] L. A. Curtiss, K. Raghavachari, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1293.
- [19] F. A. Evangelista, A. Paul, H. F. Schaefer III, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3565.
- [20] M. Zierhut, W. Roth, I. Fischer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 5178–5183.
- [21] K. Aflatooni, G. A. Gallup, P. D. Burrow, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 6205.