

Elementare Prozesse der Strahlenschädigung von DNA

Petra Swiderek*

Stichwörter:

DNA-Schäden · Gasphasenreaktionen · Ionisation · Niederenergetische Elektronen · Reaktionsmechanismen

Die Stabilität und korrekte Replikation von DNA als dem Träger der Erbinformation ist von fundamentaler Bedeutung für alle lebenden Organismen. Eine Gefährdung geht hier von ionisierender Strahlung (UV-Strahlung, Röntgen-Strahlung usw.) aus, die Schäden in der DNA induziert.^[1] Wünschenswert ist daher ein detailliertes Verständnis von Strahlenschäden auf molekularer Ebene oder (konkreter) der elementaren Schritte, die letztlich zur Mutagenese des Genoms oder zu Krebs führen.

Die Ionisation der DNA-Basen wurde als einer der Elementarschritte identifiziert, die Strahlenschäden auslösen können, und wird daher mit hoher Energieauflösung untersucht.^[2] Das durch Ionisation erzeugte positive Loch (d.h. ein Radikalkation) kann in einem Folgeschritt entlang des Strangs wandern. Dieser Prozess wird in DNA untersucht, die durch Anbindung von Elektronenacceptoren modifiziert ist, wodurch bei lichtinduzierter Anregung eine positive Ladung in den Strang injiziert wird.^[3] Die Befunde belegen, dass die Migration eines Lochs bevorzugt durch Ladungstransfer auf Guanineinheiten (G) erfolgt, die leichter oxidiert werden als die anderen DNA-Basen. In Abwesenheit von G dient alternativ Adenin (A) als intermediärer Ladungsträger. Eine oxidative Schädigung von DNA tritt letztlich an den G⁺-Positionen als Konkurrenzprozess zu einer

weiteren Migration der Ladung auf.^[3] Ein anderes Beispiel für Strahlenschädigung in DNA, das als Auslöser für Hautkrebs angesehen wird, ist die photochemische Dimerisierung benachbarter Cytosin(C)- und Thymin(T)-Basen, die unter Einwirkung von UV-Strahlung auftreten kann.^[4]

Ein vollständiges Bild der Strahlenschädigung von DNA muss berücksichtigen, dass die Schäden nicht nur durch die primäre Wechselwirkung mit hochenergetischer Strahlung ausgelöst werden, sondern dass auch sekundäre Partikel wie Ionen, Radikale und ballistische Elektronen, die entlang der Ionisationsspur produziert werden, eine wichtige Rolle spielen.^[5] Die meisten dieser Produkte, die in großer Zahl gebildet werden (ca. 10⁵/MeV) und unter denen Elektronen den größten Anteil haben, weisen Energien von weniger als 30 eV auf.^[6] Daher konzentriert sich ein aktueller Bereich der Forschung zu Strahlenschäden auf die Wechselwirkung von niederenergetischen Elektronen, d.h. von Elektronen mit kinetischen Energien unterhalb von 10–20 eV, mit DNA oder deren Untereinheiten.^[5]

Es konnte gezeigt werden, dass bereits unterhalb der Ionisationsschwelle eine Vielzahl von dissoziativen Reaktionspfaden existiert (Abbildung 1).

Die Untersuchungen zu den Auswirkungen der Wechselwirkung niederenergetischer Elektronen mit DNA folgen zwei unterschiedlichen Strategien: In einer Art Top-down-Ansatz werden die Schäden in DNA-Strängen in Abhängigkeit von der Energie der einfallenden Elektronen (E_0) quantifiziert. Als Modellsystem für diese Experimente wurde Plasmid-DNA in ihrer superspiralisierten Form (supercoiled) auf einer metallischen Unterlage deponiert.^[5] Der Nachweis der bei Elektronenbestrahlung im Ultrahochvakuum (UHV) gebildeten Produkte erfolgte zum einen ex situ durch Elektrophorese^[7b,8] und zum anderen in situ, d.h. unmittelbar unter Elektronenbestrahlung, durch massenspektrometrische Detektion der elektronenstimulierten Desorption (ESD) von negativ geladenen Fragmenten.^[9]

Die Ionenausbeuten bei ESD in Plasmid-DNA sind erst ab 6–7 eV nachweisbar, wobei ein Maximum um

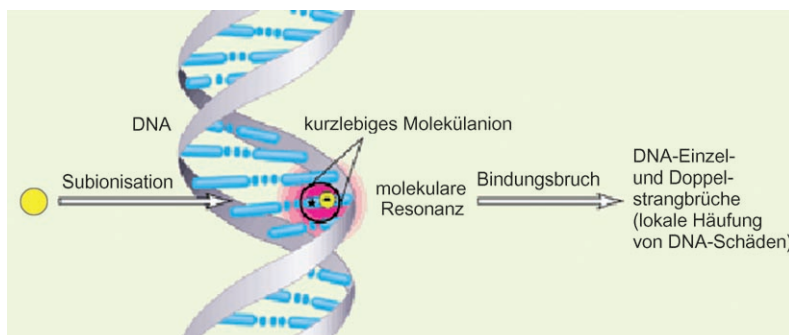


Abbildung 1. Die Wechselwirkung niederenergetischer Elektronen mit DNA führt bereits bei Energien unterhalb der Ionisationsschwelle zu Strangbrüchen. (Mit Genehmigung aus Lit. [7a]. Copyright *Science Magazine*, 2000.)

[*] Prof. Dr. P. Swiderek
Universität Bremen
Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)
Institut für Angewandte und Physikalische Chemie
Leobener Straße
28359 Bremen (Deutschland)
Fax: (+49) 421-218-4918
E-mail: swiderek@uni-bremen.de

10 eV der Bildung und dem anschließenden Zerfall von kurzlebigen negativen Ionen (Resonanzen) zugeschrieben wird.^[9] Die elektrophoretische Analyse belegt, dass hier Einzelstrangbrüche (ESB) und Doppelstrangbrüche (DSB) auftreten (Abbildung 2). Neuere, emp-

wurde.^[5] Wie sich aus der Bestimmung der Transmission von Photoelektronen durch solche SAMs ergab, skaliert die Wahrscheinlichkeit für den Einfang von Elektronen in Einzelsträngen mit der Zahl der G-Basen und hängt von deren Anordnung ab.^[11] Experimente zur Zweiphotonen-Photoemission am gleichen System zeigten darüber hinaus, dass das Elektron nach seiner Anlagerung auf dem Zucker-Phosphat-Gerüst oder zwischen den einzelnen Molekülen des SAM lokalisiert wird, wobei Einzelstrang-DNA die Elektronen effizienter einfängt als Doppelstrang-DNA.^[11]

Will man den Ursprung der beschriebenen Schäden in DNA verstehen, sind Informationen über die Details der durch Elektronenanlagerung ausgelösten Prozesse auf molekularem Niveau erforderlich. Diese werden mit einem Bottom-up-Ansatz erhalten, der zu den bisher beschriebenen Experimenten komplementär ist. Bei diesem Ansatz wird die Wechselwirkung niederenergetischer Elektronen mit einzelnen Untereinheiten der DNA, nämlich den isolierten Basen, dem Zucker sowie Phosphat-Einheiten zuerst im Detail charakterisiert, bevor die analogen Prozesse in

größeren Untereinheiten untersucht werden.^[5] So sollte sich Schritt für Schritt die Sequenz der elementaren Prozesse aufklären lassen, die nach Elektronenanlagerung an eine bestimmte Untereinheit ablaufen, was sowohl die Migration des Überschusselektrons als auch die bevorzugten Reaktionspfade auf dem Weg zur DNA-Schädigung nach Lokalisierung der Ladung umfasst.

Experimente in der Gasphase ermöglichen die Untersuchung von isolierten DNA-Bausteinen oder von Untereinheiten aus wenigen dieser Bausteine. Dazu werden gekreuzte Elektronen- und Molekularstrahlen mit Massenspektrometrie kombiniert, um die negativ geladenen Produkte nachzuweisen, die durch dissoziative Elektronenanlagerung (DEA) gebildet werden (Abbildung 3). Seit dem ersten

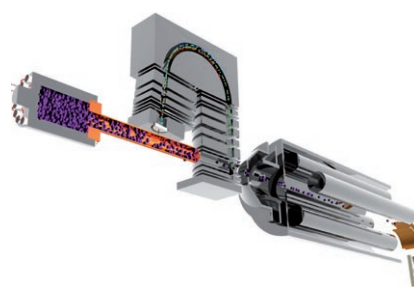


Abbildung 3. Experimenteller Aufbau für den Nachweis negativ geladener Produkte, die durch Anlagerung von niederenergetischen Elektronen an gasförmige Untereinheiten der DNA erhalten werden. Ein Molekülstrahl, der mittels eines Ofens erzeugt wird (links), wird mit einem monochromatischen Elektronenstrahl aus einem hemisphärischen Energieanalysator mit einer typischen Auflösung von 50–150 meV (oben) gekreuzt. Negativ geladene Produkte werden mithilfe eines Quadrupol-Massenspektrometers nach ihrer Masse selektiert und nachgewiesen (rechts). Die Ionenausbeute für spezifische Massen wird in Abhängigkeit von der Elektronenenergie (E_0) gemessen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Paul Scheier.

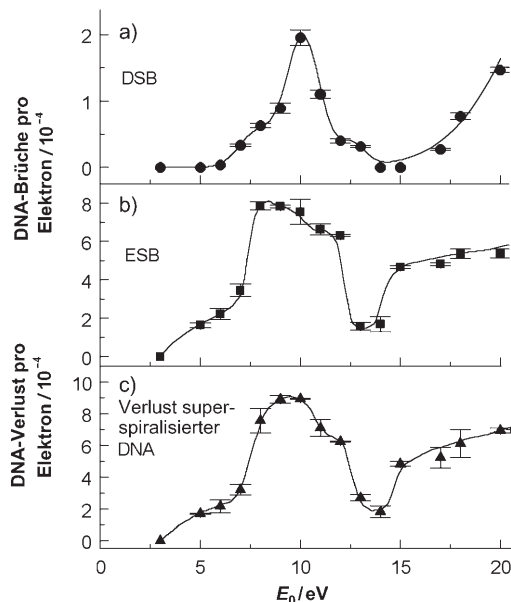


Abbildung 2. Quantenausbeute für die Erzeugung von Doppelstrangbrüchen (DSB, a), Einzelstrangbrüchen (ESB, b) und für den Zerfall der superspiralisierten Plasmid-DNA im festen Zustand (c) bei Bestrahlung mit niederenergetischen Elektronen der Energie E_0 . (Mit Genehmigung aus [7b]. Copyright Science Magazine, 2000.)

findlichere Experimente zeigen nun aber, dass ESBs auch schon bei E_0 -Werten unterhalb von 1 eV auftreten.^[8]

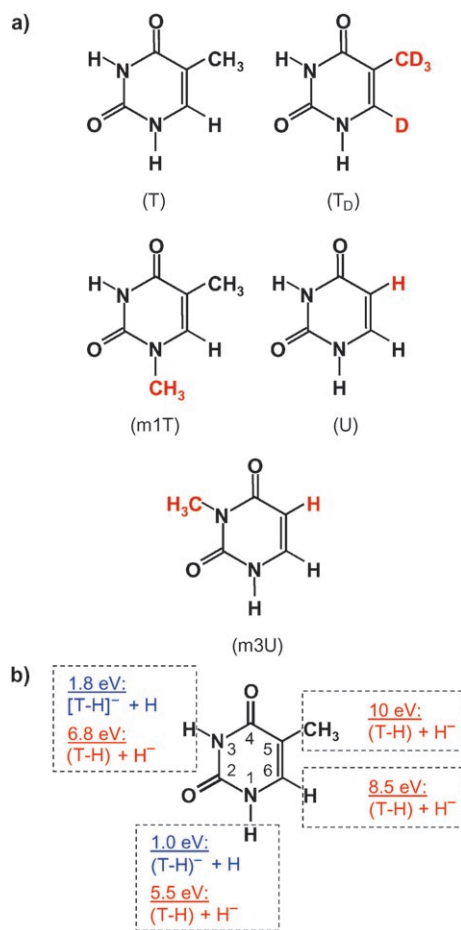
Modellstudien an selbstorganisierten Monolagen (SAMs) aus kurzkettigen DNA-Einzel- und Doppelsträngen auf Goldoberflächen eröffnen eine interessante Möglichkeit, weitere Details der elektroneninduzierten Schädigung von DNA aufzuklären. So wurde kürzlich eine Mikroarray-Technik in Verbindung mit Fluoreszenz-Markern eingesetzt, um die Schädigung in Abhängigkeit von der Elektronendosis zu quantifizieren.^[10] Die chemische Stabilität von DNA-Basen gegenüber Bestrahlung mit niederenergetischen Elektronen sowie der Einfluss der Basensequenz auf diese Stabilität wurden untersucht, indem die Desorption neutraler Fragmente in SAMs aus Homo- und Hetero-Oligonucleotiden gemessen

Nachweis, dass derartige Studien zur Wechselwirkung von Elektronen mit DNA-Untereinheiten in der Gasphase machbar sind,^[12] hat eine wachsende Zahl von Experimenten an isolierten DNA-Basen deren Neigung zur Dissoziation belegt. In der Tat wird in Einklang mit den Befunden für Plasmid-DNA^[5,7,8] eine Fragmentierung bereits bei E_0 -Werten im Bereich von 0.5 bis 1 eV beobachtet,^[5,13,14] d.h. weit unterhalb der Ionisationsschwelle. Der dominierende Reaktionspfad liefert unter Verlust eines einzelnen Wasserstoffatoms das Produkt $[M-H]^-$ ($M = C, T, A, G$).^[5,13,14] Dagegen zerfällt die Zuckereinheit, Desoxyribose, bereits nahe 0 eV in unterschiedliche Fragmente,^[15] was darauf schließen lässt, dass der Zucker eine besonders empfindliche Untereinheit des DNA-Strangs ist. Über Gasphasenstudien zur Phosphatereinheit wurde bisher nicht berichtet, allerdings zeigt ESD an festen Filmen von $NaPO_2(OH)_2$ eine Desorption von OH^- bei 8 eV.^[5]

Gemäß Experimenten zur Ladungsinjektion erfolgt die Migration des Überschusselektrons auf einer B-DNA-Doppelhelix vorzugsweise durch einen thermisch aktivierten Hopping-Mechanismus unter Beteiligung der T- und C-Einheiten.^[3] Diese beiden Basen sind

leichter zu reduzieren als A und G, wobei $T^{\cdot-}$ geringfügig gegenüber $C^{\cdot-}$ bevorzugt ist. In Einklang mit diesen Befunden haben sich Versuche zur Aufklärung der molekularen Details von elektroneninduzierten Prozessen bei niedrigen E_0 -Werten bisher auf T konzentriert.^[16–19]

Die Energieabhängigkeit der Ausbeute an negativ geladenen Fragmenten nach Anlagerung niederenergetischer Elektronen an T zeigt aufgrund resonanter Prozesse eine reiche Struktur.^[18] Durch einen detaillierten Vergleich von DEA bei teilweise deuteriertem T und Uracil (U) sowie selektiv methyliertem T und U (m1T und m3U, Schema 1) lassen sich die Dissoziationsprozesse aufklären, die bei unterschiedlichen E_0 -Werten auftreten. Die Bildung von

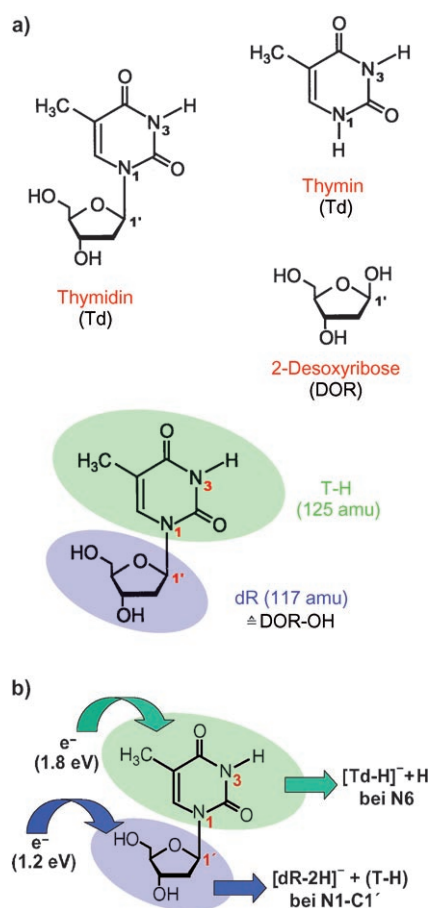


Schema 1. a) Thymin-verbundene Verbindungen, die mittels DEA untersucht wurden. b) Bindungsselektive (C-H gegenüber N-H) und positionselektive (N3-H gegenüber N1-H, C6-H gegenüber CH_2 -H) dissoziative Elektronenanlagerung (DEA) am Thymin (T) gelang durch Wahl geeigneter Energien der einfallenden Elektronen.^[13,16–19] Abbildungen zur Verfügung gestellt von Paul Scheier.

$[T-H]^{\cdot-}$ unter Abspaltung eines neutralen H-Atoms aus T findet bei 0.6–3 eV statt.^[13,18,19] Nach selektiver Deuterierung der Kohlenstoffpositionen wird weiterhin die Bildung von $[T-H]^{\cdot-}$ im gleichen Energiebereich beobachtet, nicht aber die des Fragments $[T-D]^{\cdot-}$. Die Elektronenanlagerung bei solchen niedrigen Energien ist also bindungsselektiv, d. h., sie führt zur Dissoziation der N-H-Bindungen, aber nicht der C-H-Bindungen.^[13] Darüber hinaus belegt DEA an m1T, das an der N1-Position methyliert ist, die energieabhängige Positionselektivität, da die Bildung von $[m1T-H]^{\cdot-}$ bei $E_0 \approx 1$ eV vollständig unterdrückt ist, während das Signal um 1.8 eV weiterhin auftritt.^[19] Der Reaktionspfad bei tiefster Energie wird daher der Dissoziation der N1-H-Bindung zugeschrieben, während der zweite Prozess die N3-H-Bindung betrifft. Dieser Befund liefert ein schönes Beispiel für Reaktionskontrolle durch Anlagerung niederenergetischer Elektronen.

Durch Vergleich der $H^{\cdot-}$ - und $D^{\cdot-}$ -Ionenausbeuten für T, U und ihre Derivate wurde auch die Herkunft von $H^{\cdot-}$ geklärt, das bei DEA an T im Energiebereich von 5 bis 11 eV beobachtet wird.^[16,17] Hier gibt es vier DEA-Pfade bei 5.5, 6.8, 8.5 und 10 eV, die zu selektiver Dissoziation an N1, N3, C6 bzw. der Methylposition führen (Schema 1).

Als erster Schritt hin zu einer vollständigen Modellierung von DNA im Sinne des beschriebenen Bottom-up-Ansatzes wurde kürzlich das Nucleosid Thymidin (Td) untersucht, das aus T und dem über seine N1-Position gebundenen Zucker Desoxyribose (DOR) aufgebaut ist (Schema 2a).^[20] Hier gibt es zwei DEA-Pfade bei niedrigen E_0 -Werten (Schema 2b). Die Anlagerung von Elektronen bei 1.2 eV findet am Zucker statt und führt zum Bruch der Bindung zwischen den Untereinheiten (T-H) und dR (= DOR-OH), was durch das beobachtete Produkt $[dR-2H]^{\cdot-}$ belegt wird. Bei 1.8 eV wird hingegen ein Elektron an die (T-H)-Einheit angelagert. Dieser Prozess liefert im Wesentlichen intaktes Td, wobei lediglich an der N3-Position ein H-Atom abgespalten wird, wie die Bildung des Fragments $[Td-H]^{\cdot-}$ und die starke Ähnlichkeit des DEA-Signals zu demjenigen von m1T zeigen. Innerhalb des Zeitfensters dieses Experiments (einige μ s) migriert al-



Schema 2. a) Nomenklatur und Massen der charakteristischen Untereinheiten von Thymidin. b) Energieselektive Dissoziationspfade nach Anlagerung niederenergetischer Elektronen an Thymidin (Td). Ein Ladungstransfer von (T-H) nach dR wird nicht beobachtet.^[20] Abbildungen zur Verfügung gestellt von Eugen Illenberger.

so ein Elektron, das zunächst an die (T-H)-Einheit angelagert wurde, nicht zur dR-Einheit, wo es einen Bindungsbruch zwischen den zwei Bausteinen auslösen würde, wie er auch bei 1.2 eV auftritt. Dies widerspricht einer kürzlich veröffentlichten^[21] und in Lit. [20] diskutierten theoretischen Vorhersage, dass ein Elektronentransfer aus einem tief liegenden π^* -MO der Base in ein tief liegendes σ^* -MO des DNA-Gerüsts stattfinden sollte.

Td ist das bisher größte durch DEA in der Gasphase untersuchte DNA-Modellfragment. Als nächste Schritte dürften eine detaillierte Studie der Fragmentationspfade in anderen DNA-Basen sowie die Addition einer Phosphateinheit an das Nucleosid, also die Untersuchung eines Nucleotids, folgen.

Dies wird neue Fragen nach den Auswirkungen von koordiniertem Wasser und der Basenpaarung sowie der Bildung von Basenstapeln aufwerfen. Damit werden auch verbesserte experimentelle Techniken für die Präparation des Molekularstrahls (z.B. MALDI) und für die schrittweise Addition der Hydratationsschale erforderlich werden, um letztlich zu einem Modell zu gelangen, das die Verhältnisse in lebenden Organismen besser wiedergibt.

Die nächsten Aufgaben warten also; es wurde aber auch bereits viel erreicht, wie sich beim Vergleich mit Studien zur Ladungsmigration zeigt. Hier wurde interessanterweise gefunden, dass der reduktive Ladungstransfer, d.h. die Migration eines Überschusselektrons, keine DNA-Schäden hervorruft.^[3] Dies scheint einerseits dem Befund zu widersprechen, dass Elektronenanlagerung an DNA zu einer Schädigung führt; andererseits zeigt die Studie zu DEA in Td, dass die Anlagerung eines Elektrons an die (T–H)-Einheit zu einer Situation führt, aus der sich nicht notwendigerweise die Dissoziation einer Bindung zwischen zwei DNA-Bausteinen ergibt.^[20] Dies ist voll in Einklang mit der Sichtweise, die aus den

Messungen der Ladungsmigration resultiert. Der Bottom-up-Ansatz zur Aufklärung der Strahlenschädigung von DNA hat sich also offenbar bewährt.

- [1] R. V. Bensasson, E. J. Land, T. G. Truscott, *Excited States and free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, **1993**, S. 143.
- [2] K.-W. Choi, J.-H. Lee, S. K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15674.
- [3] H.-A. Wagenknecht in *Charge Transfer in DNA* (Hrsg.: H.-A. Wagenknecht), Wiley-VCH, Weinheim **2005**, S. 1.
- [4] J.-S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 76.
- [5] L. Sanche, *Eur. Phys. J. D* **2005**, *35*, 367.
- [6] International Commission on Radiation Units and Measurements, ICRU Report 31 (ICRU, Washington, DC), **1979**.
- [7] a) B. D. Michael, P. O'Neill, *Science* **2000**, *287*, 1603; b) B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, L. Sanche, *Science* **2000**, *287*, 1658.
- [8] F. Martin, P. D. Burrow, Z. Cai, P. Cloutier, D. Hunting, L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 068101.
- [9] X. Pan, P. Cloutier, D. Hunting, L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 208102.
- [10] T. Solomun, C. Hultschig, E. Illenberger, *Eur. Phys. J. D* **2005**, *35*, 437.
- [11] S. G. Ray, S. S. Daube, R. Naaman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15.
- [12] M. A. Huels, I. Hahndorf, E. Illenberger, L. Sanche, *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 1309.
- [13] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 168103.
- [14] S. Denifl, S. Ptasińska, M. Probst, J. Hrušák, P. Scheier, T. D. Märk, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 6562.
- [15] S. Ptasińska, S. Denifl, P. Scheier, T. D. Märk, *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 8505.
- [16] S. Ptasińska, 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.
- [17] S. Ptasińska, S. Denifl, V. Grill, T. D. Märk, E. Illenberger, P. Scheier, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 093201.
- [18] S. Ptasińska, S. Denifl, B. Mróz, M. Probst, V. Grill, E. Illenberger, P. Scheier, T. D. Märk, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 124302.
- [19] S. Ptasińska, S. Denifl, P. Scheier, E. Illenberger, T. D. Märk, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7101; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6941.
- [20] S. Ptasińska, S. Denifl, S. Gohlke, P. Scheier, E. Illenberger, T. D. Märk, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1926; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1893.
- [21] J. Berdys, I. Anusiewicz, O. Skurski, J. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6441.