

DNA- og RNA-byggesten: deres fotofysik i opløsning og gasfase

Her beskrives nucleobasers fotofysik i opløsning, og hvordan vi i Aarhus vha. lagerrings-eksperimenter på isolerede nucleotider forsøger at afdække deres spændende fysik og kemi

Af Steen Brøndsted Nielsen, Institut for Fysik og Astronomi, Aarhus Universitet

Naturens valg af nucleobaser i DNA og RNA skyldes sandsynligvis ikke kun de særlige Watson-Crick basepar, der på smukkeste vis forklarer DNA-replikation, RNA-transskription og proteinsyntese, men også at nucleobaserne virker som effektive solskærme mod ultraviolet stråling. Men hvordan er nucleotidernes fysik og kemi?

Nucleotider er DNA- og RNA-byggesten og indeholder en nucleobase, et sukkermolekyle og en fosfatgruppe (figur 1). Et nucleotid uden fosfatgruppen benævnes et nucleosid. Nucleobasers og nucleosiders fotofysik er velundersøgt, både når de er i opløsning og isolerede i gasfase (for nucleobasers vedkommende), og er detaljeret beskrevet i en nylig *Chemical Review* artikel [1]. Gasfaseeksperimenter er med til at give en forståelse af molekylernes karakteristiske egenskaber og er dermed væsentlige for at afdække opløsningsmidlets rolle.

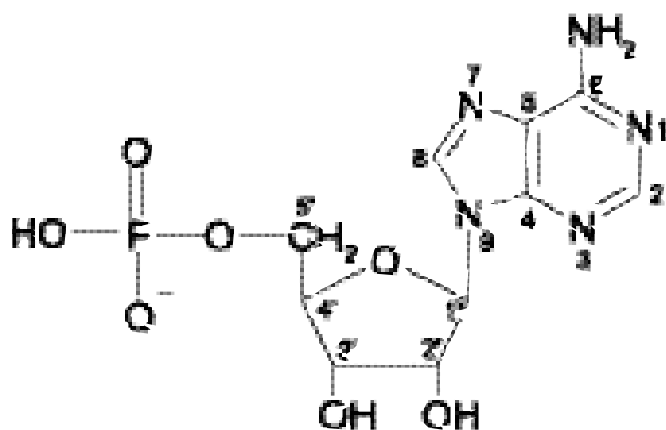
Nucleobaser absorberer ultraviolet (UV) lys, maksimalt ved 260 nm. Den elektroniske overgang angives $S_0 \rightarrow S_1$, hvor S_0 er den elektroniske grundtilstand og S_1 den første exciterede tilstand (S angiver singlettilstand, dvs. totalt spin er nul). Excitationen sker til en antibindende π^* orbital. Fluorescenskvanteudbyttet er meget lille ($<10^{-4}$), og det samme er sandsynligheden for krydsning til en lavereliggende tripletttilstand, T_1 (to uparrede elektroner med parallelle spin, dvs. totalt spin én). Det antyder, at S_1 -tilstandens levetid er kort mht. indre omdannelse til S_0 .

Nucleobaser er effektive solskærme

For fire år siden udførte Bern Kohler og hans gruppe på Ohio State University nogle opsigtsvækkende eksperimenter, som bestemte nucleosiders S_1 -levetid efter UV-fotoexcitation i vandig opløsning [2,3]. Denne information er vigtig, da elektronisk exciterede molekyler ofte er meget reaktive. DNA's dobbelthelixstruktur bygger på, at adenin hydrogenbinder med thymin og guanin med cytosin (de såkaldte Watson-Crick basepar [4], figur 2). Det er katastrofalt at miste denne præference, fordi en nucleobase modificeres kemisk efter fotoexcitation. Det fører til fejl i den genetiske kode og dermed mutationer. I værste fald cancer.

Med tidsopløst femtosekundspektroskopi målte Kohlers gruppe, at $S_1 \rightarrow S_0$ foregik i løbet af nogle få hundrede femtosekunder. Dvs. den farlige elektroniske energi omsættes ultrahurtigt til varme (vibrationsenergi) i molekylerne. Hurtig omdannelse af elektronisk energi til varme forekommer ofte, når to potentielle energioverflader rører ved hinanden i et punkt i et tredimensionelt rum, hvor to af akserne er geometrikoordinater. Et sådant punkt benævnes et konisk krydsningspunkt [5] og er teoretisk beregnet for deexcitationen af cytosin-nucleobasen [6].

Endvidere fandt de, at de varme nucleosider nedkøles til



Figur 1. Strukturen af AMP-nucleotidanionen.

stuetemperatur i vandig opløsning efter nogle få picosekunder. Denne tid er også usædvanlig kort og skyldes hydrogenbinding af omgivende vandmolekyler til nucleosidet, og dermed en god kobling mellem nucleosidets og vandmolekylernes egensvingninger. Slutresultatet af fotoexcitationen er således uskadelig varme i det store »vandbad«.

Populært sagt virker nucleobaserne som effektive solskærme. Det kan have spillet en afgørende rolle for livets opståen på jorden for mere end en milliard år siden, før det beskyttende ozonlag var til stede. Idet kun fotostabile molekyler overlevede den stærke UV-bestråling, kan vi tale om »survival of the fittest« på molekylært niveau.

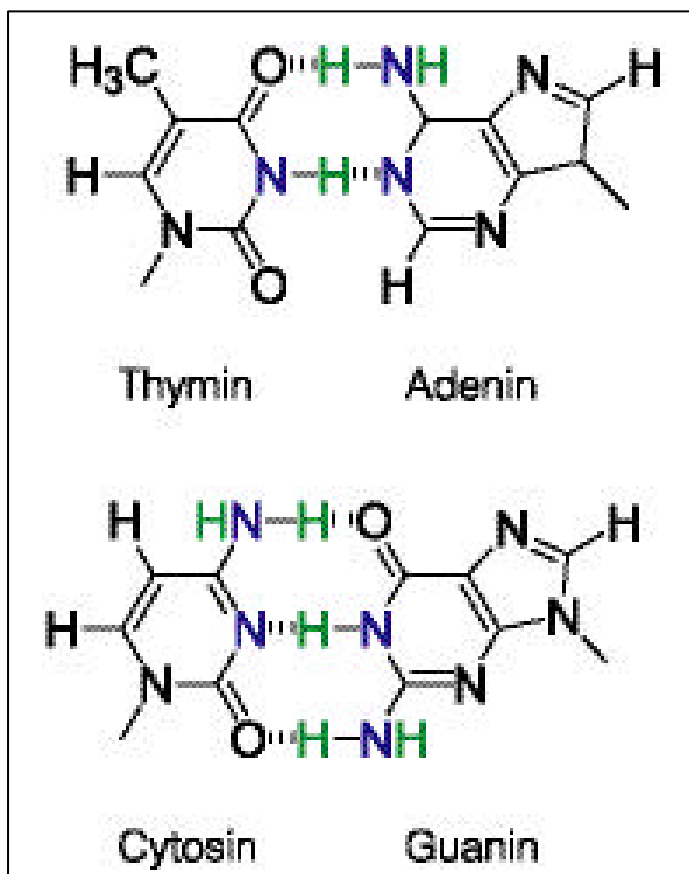
Ubesvarede spørgsmål

Dette banebrydende arbejde efterlader imidlertid en række ubesvarede spørgsmål.

Dissocierer nogle af de bestrålede nucleosider, mens de er i S_1 , omend levetiden af S_1 er kort? Det kan ske, hvis der er en reaktionsvej på den exciterede tilstandsoverflade med ingen eller kun lille aktiveringsenergi.

Da det er nucleobasen, som elektronisk exciteres, vil den indre omdannelsesproces føre til vibrationel excitationenergi hovedsageligt i nucleobasen. Til at begynde med besidder få svingninger derfor excitationenergien (ikke-statistisk fordeling), men i løbet af picosekunder fordeles energien statistisk på alle molekylets svingninger bestemt af deres vibrationsenergi (jf. Boltzmanns fordeling). Med andre ord kanaliseres noget af energien ud i sukker- og fosfatgruppen. På engelsk betegnes dette *intramolecular vibrational redistribution* (IVR). Men er dissociation før IVR mulig, dvs. mens det meste af vibrationsenergien er lokaliseret i nucleobasen?

Selv efter IVR konkurrerer dissociation med nedkøling?



Figur 2. Watson-Crick basepar.

Den sidste proces er en statistisk dissociationsproces, mens en hurtigere dissociation er ikke-statistisk. En statistisk dissociationsproces defineres således som en proces, der kan beskrives med et statistisk udtryk for hastighedskonstanten, f.eks. det velkendte Arrheniusudtryk. Ionen antages at være i den elektroniske grundtilstand, og dens mikrokanoniske temperatur er bestemt af energien før excitationen og af fotonenergien. Dvs. vores spørgsmål kan sammenfattes til: hvad er sandsynligheden for beskadigelse via ikke-statistiske eller statistiske dissociationsprocesser?

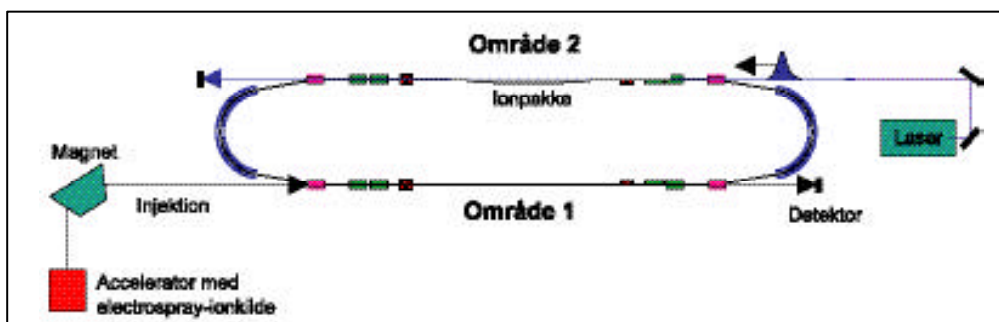
For at besvare dette er gasfaseeksperimenter nødvendige. Vi har behov for at finde hastighedskonstanter for processerne i de isolerede molekyler, og det er her lagerringseksperimenter kommer ind i billedet.

Den århusianske lagerring ELISA

I det følgende gives først en kort beskrivelse af lagringen ELISA (*ELectrostatic Ion Storage Ring in Aarhus*), hvorefter nogle nylige data for fotodissociation af AMP-nucleotidioner præsenteres.

Instrumentet er vist skematisk på figur 3 og består af en ionkilde, et accelerationsområde, en magnet, en injektionsdel og endelig selve ringen [7,8]. I ringen, eller racerbanen, kan lagres såvel atomare som molekylære ioner.

Ioner i opløsning bringes på gasform med electrospray ionisering. De dannede ioner akkumuleres først i en ionfælde, typisk i et tiendedel sekund, når en 10 Hz pulseret laser bruges til fotoexcitation. Herefter accelereres de igennem et spændingsfald på 22 kV, og ioner med det ønskede masse/ladningsforhold (m/z) udvælges med magneten og injiceres i ringen.



Figur 3. Lagringen ELISA. Se tekst for detaljer.

Nyt om...

naturens allener

De mest kendte diener er konjugerede diener; men der findes også nogle, hvor de to dobbeltbindinger går til samme C-atom, allener.



Columbianske giftige pilefrøer har i deres hud en allen (1), der af indianerne har været anvendt som pilegift. En bille bruger en allen, som pheromon, seksualtiltrækkende stof. Billeden indeholder op til 0,5 g af denne allen (2).

Carl Th.

Synthesis and Properties of Allenic Natural Products and Pharmaceuticals. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 2004, **43**, 1196.

Proces Spektrometer

Ønsker du realtids-scan af din proces?

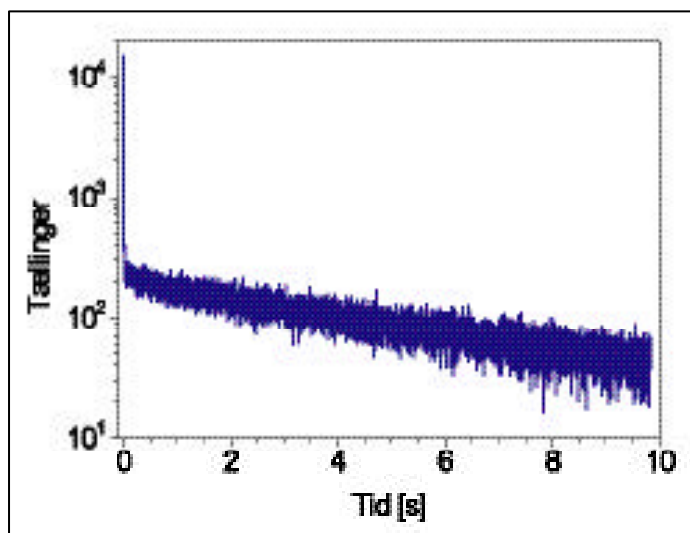
Sovias UV-Specter er et on-line Proces spektrometer designet for direkte måling i rør og tanke. På et spektrometer kan kobles op til 6 færdigpakke sensorer for transmission-, translektion-, og ATR-applikationer. En specialmodel kan anvendes i EXZONAMA 1 og 2.

Anvendelsesområderne er mange – fra simple farvemålinger og måling af koncentration til multikomponent analyse i væsker.

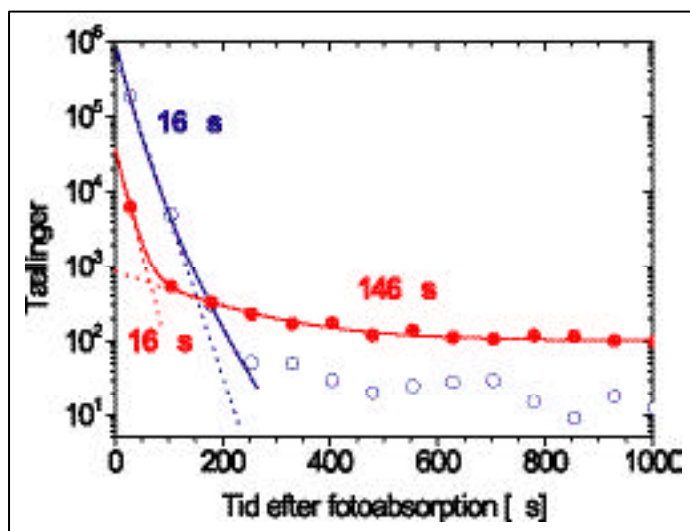


CONTECH
INSTRUMENTERING

CONTECH Instrumentering ApS · Hans Edvard Teglers Vej 5 · DK-2920 Charlottenlund
Tlf +45 3990 3905 · Fax +45 3990 3915 · www.contech.dk · e-mail: contech@contech.dk



Figur 4. AMP-anionens levetidsspektrum. Det eksponentielle henfald på sekundtidskala skyldes kollisioner med restgas i ringen. Det hurtige henfald inden for de første tyve millisekunder er fra metastabile ioner med høj indre energi, der stammer fra kollisionsaktivering ved overførsel fra ionkilden til ringen.



Figur 5. AMP-ioners levetid efter absorption af en 266 nm foton. Ionerne blev belyst efter 80 millisekunders lagringstid. De blå data er for anionen, mens de røde er for kationen. Levetiden på de 16 µs for kationen er bestemt i et andet eksperiment nærmere beskrevet i reference [9]. Afstanden mellem de diskrete punkter er ionernes omløbstid i ringen (75 µs).

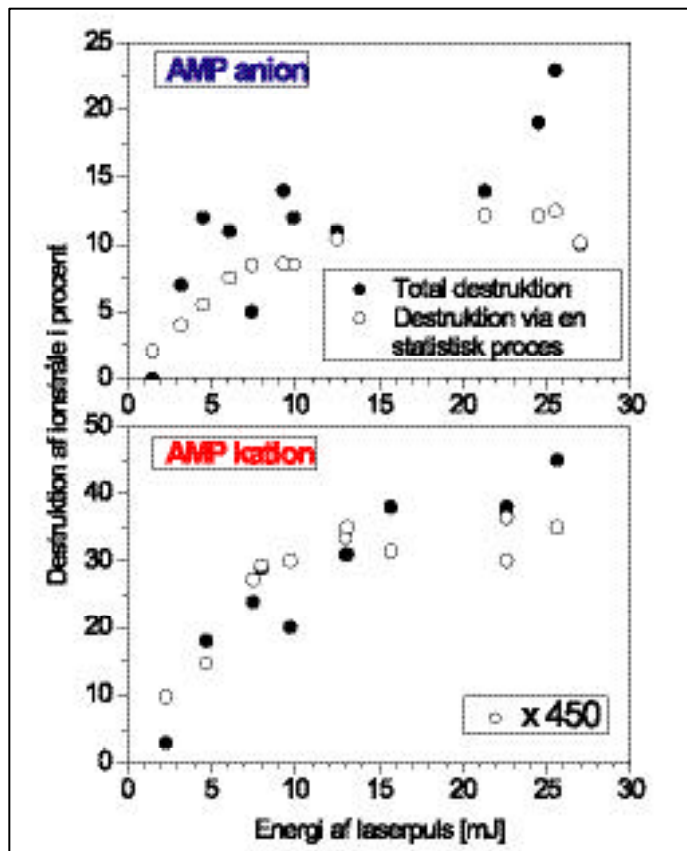
Ionerne føres rundt i ringen vha. elektriske felter. Ringens omkreds er 8.4 meter, hvilket betyder, at ionerne har omløbstider af størrelsesordenen 10 til 100 µs afhængig af deres masse og ladning. Uden ydre påvirkning er ionernes levetid bestemt af restgastrykket i ringen, da kollisioner fører til dissociation eller elektrontab. Trykket af restgas, mestendels brint, er omkring 10^{-11} mbar. Et ikke-ladet fragment mærker ikke de elektriske felter og bevæger sig derfor i den retning, dens moderion havde. Neutrale atomer eller molekyler, som dannes i midterområdet 1 (figur 3), fortsætter ligeud og rammer detektoren placeret for enden af banen. I eksperimentet tælles de neutrale produkter som funktion af tiden. Et sådant kollisionsafhængigt henfald er eksponentielt med en tidskonstant på nogle få sekunder (figur 4). Ionerne kan imidlertid belyses i den anden side af ringen (område 2 i figur 3), og hvis de fotoexciterede ioner har nok energi til at gå i stykker af sig selv, måles et større tælletal i detektoren pga. forsinket dissociation.

AMP-ioners levetid mht. dissociation efter UV-bestråling

I figur 5 er levetidsspektret for AMP-anionen efter absorption af en 266 nm foton vist [9]. Tidskonstanten for dissociation af de varme ioner er 16 µs. I dissociationen dannes adenosin-nucleosidet og PO_3^- , hvilket kræver 1.3 eV ifølge tærskelværdimålinger af Yo og Kebarle [10]. Vores data tillader os at konkludere, at fotodissociation er irrelevant, når ionerne befinder sig i opløsning, hvor de afgiver varmen i løbet af picosekunder.

Det er muligt, at en brøkdel af ionerne dissocierer via direkte ikke-statistiske processer på submikrosekund tidsskala, men instrumentets tidsopløsning er ikke tilstrækkelig til at måle disse. Dog kan betydningen af sådanne processer vurderes indirekte. Vi kan nemlig måle brøkdelen af ioner, der i alt fjernes fra ionstrålen som følge af laserpulsens og sammenholde dette tal med brøkdelen, som fjernes via den statistiske proces med tidskonstant på 16 µs. Det er nærmere beskrevet i reference [9] og bygger på simple eksponentielle henfald. Disse brøkdeler er afbildet på figur 6 som funktion af laserpulsenergien målt i mJ. Destruktionen af ioner vokser lineært med pulsenergien for lave energier lige indtil mætning, hvor alle ioner i vekselvirkningsområdet har absorberet en foton. Der er en stor usikkerhed på dataene, men vi kan konkludere, at den dominerende del af ionerne ($80 \pm 20\%$) dissocierer via en statistisk proces, da de to datasæt næsten er sammenfaldende.

I et andet eksperiment blev AMP-kationen (protoniseret adenin og neutral phosphorsyregruppe) bestrålet med UV-lys [9]. Igen blev levetiden for statistisk dissociation målt til 16 µs, men i dette tilfælde dominerer ikke-statistiske processer (figur 6). Langt mindre end 1% af ionerne dissocierer via en statistisk reaktionskanal. Det koniske krydsningspunkts topologi [11] kan være ændret således, at fotoexcitation nu fører til prompte



Figur 6. Afbildning af den totale procentdel af AMP-ioner der fotodissocierer (fyldte cirkler), og procentdelen der dissocierer via en statistisk proces (åbne cirkler) som funktion af laserlysets pulsenergi. Bemærk at for kationen er brøkdelen for den statistiske proces multipliceret med 450.

Den hvide mands fodspor

Carsten Christophersen

Den hvide mands fodspor

Nyt Teknisk Forlag, ISBN 87-571-2533-3

Best.nr. 44057-1. Kr. 189,00

Carsten Christophersen har samlet en stribe historier fra molekylernes verden i denne tiltalende, lille bog. Bogens lidt mystiske titel er et indiansk navn for planten vejbred. I en af historierne fortælles om vejbredds mange helbredende virkninger. Det indianske navn skyldes, at europæere har bragt vejbredds små klæbrige frø rundt i verden på fodtøj og køretøjer.

Bogen er en samling af artikler, der tidligere har været trykt i dansk kemi. Det er en fin samling af eksempler på molekylers forekomst i naturen, deres egenskaber samt fordele og problemer ved anvendelser. Artiklerne er på 2-5 sider, og de er samlet i løse temaer om helbredende virkning, gifte fra havet, rusmidler, råstoffer, miljø og farvestoffer. Da der er tale om en artikelsamling, er bogen ikke beregnet til at læse i sammenhæng. Læs artiklerne enkeltvis og lad informationerne bundfælde sig.

Bogen rækker f.eks. fra mayaers brug af indigo og gummi, over giftige spisefisk, rusmidler og GMO'er til methanhydrat som et bud på fremtidens energikilde.

I relation til undervisning er bogens eksempler gode til perspektivering af den daglige undervisning. Bogen er ikke en undervisningsbog, men enkeltartikler vil fint kunne anvendes enten af læreren eller af gymnasieelever til oplæg for klassen. Som angivet i forordet kræver bogen et begrænset kendskab til kemi. En gymnasieelev med gåpåmod kan sagtens læse bogen. Til støtte er der efter hver artikel en velvalgt ordliste, som dog ikke altid vil være tilstrækkelig. Efter hver artikel findes gode opklarende spørgsmål og diskussionsemner. Nogle af spørgsmålene kan besvares ud fra teksten, andre kræver lidt informationsøgning. Der spørges f.eks. om, hvad en ether er, og hvor Andes-regionen ligger. Diskussionsspørgsmålene er af typen »Hvordan kan forskelle i tandsundheden forklares ved sociale forskelle«, dette eksempel findes i artikel om fluorid. Nogle af artiklerne kan bruges som inspiration til tværfagligt samarbejde. Til gymnasiebrug er det et stort plus, at bogen er på dansk.

Carsten Christophersen er kendt som en dygtig og erfaren formidler, bl.a. i redaktionen af dette blad. Hans viden og fortællelyst skinner tydeligt igennem. Jeg synes, at han med stort held sætter de små interessante historier ind i større sammenhænge. F.eks. breder en artikel om anvendelse af hajbrusk mod kræft sig ud til generel omtale af afprøvning af nye lægemidler og godkendelse af disse.

Bogen er god lystlæsning til alle med nysgerrighed efter naturens mysterier og sammenhænge, og den hører hjemme i ethvert gymnasiebibliotek.

Erik Holm Mortensen, Midtffyns Gymnasium

dissociation i stedet for tilbagevenden til grundtilstanden for AMP-kationen.

Endnu færre ioner dissocierer via en anden kanal med en tidskonstant på 146 μ s (figur 5), der tilskrives krydsning til en lavereliggende tripplettilstand, T_1 , efter excitation til S_1 . Krydsning fra T_1 til S_0 er spinforbudt og er flaskehals for dissociationen.

Slutbemærkninger

I vandig opløsning afhænger AMP's ioniseringsform af pH-værdien. Protoniseret adenins pK_a -værdi er 4.1, og ved neutral pH er nucleobasen derfor neutral. Dvs. i et biologisk miljø er AMP-anionen den dominerende form. Eksperimenterne viser, at der kan ses bort fra statistisk unimolekylær dissociation (mikrosekundtidskala) efter fotoexcitation, da ionerne er kølet ned inden vekselvirkninger med vandmolekyler (picosekundtidskala). Samtidig er ikke-statistiske dissociationsprocesser negligerbare for anionerne, hvilket er i fin overensstemmelse med en ultrakort levetid af den exciterede tilstand (få hundrede femtosekunder). Deexcitationen sker højst sandsynligt via et konisk krydsningspunkt (mere nøjagtigt: *sloped conical intersection* [11]). Det støtter hypotesen om, at nucleobasers fotostabilitet har været vigtig for arvematerialets dannelse og dermed forudsætningen for liv på jorden. Fremtidige målinger på oligonucleotider er planlagte for at få flere detaljer om energitransportprocesserne i DNA og RNA.

Taksigelser

En stor tak rettes til mine samarbejdspartnere på Aarhus Universitet omkring dette projekt: Jens Ulrik Andersen, Preben Hvelplund, Shigeo Tomita, Ulrik V. Pedersen og Liu Bo samt James S. Forster fra Université de Montréal.

E-mail-adresse:

Steen Brøndsted Nielsen: sbn@phys.au.dk

Referencer

1. C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler, *Chem. Rev.* **104**, 1977-2019 (2004).
2. J.-M. L. Pecourt, J. Peon og B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9348-9349 (2000).
3. J.-M. L. Pecourt, J. Peon og B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10370-10378 (2001).
4. J. D. Watson og F. H. C. Crick, *Nature* **171**, 737-738 (1953).
5. Koniske krydsningspunkter har vist sig at forekomme hyppigere end hidtil antaget, og deres identifikation er i dag noget, der optager mange kvantekemikere. Et indlysende krav er mindst tre atomer i molekylet, men det vil føre for vidt i denne artikel at give en detaljeret kvantekemisk beskrivelse; i stedet henvises interesserede til denne netop udkomne bog: W. Domcke, D. R. Yarkony og K. Köppel, *Conical Intersections: Electronic structure, Dynamics and Spectroscopy*, World Scientific, Singapore (2004).
6. N. Ismail, L. Blancafort, M. Olivucci, B. Kohler og M. A. Robb, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6818 (2002).
7. S. P. Möller, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **394**, 281-286 (1997).
8. J. U. Andersen, P. Hvelplund, S. Brøndsted Nielsen, S. Tomita, H. Wahlgreen, S. P. Möller, U. V. Pedersen, J. S. Forster og T. J. D. Jørgensen, *Rev. Sci. Instrum.* **73**, 1284-1287 (2002).
9. S. Brøndsted Nielsen, J. U. Andersen, J. S. Forster, P. Hvelplund, B. Liu, U. V. Pedersen og S. Tomita, *Phys. Rev. Lett.* **91**, 048302 (2003).
10. Y. Ho og P. Kebarle, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **165**, 433-455 (1997).
11. Når et minimum på den exciterede tilstandsoverflade indtræffer for krydsningspunktet (på engelsk betegnes dette et *sloped conical intersection*), dannes der ikke fotoprodukter. I modsat fald (*peaked conical intersection*) konkurrerer dannelse af fotoprodukter med deexcitationen.

