

Autoreferat

1. **Imię i Nazwisko:** **Janina Kopyra**

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

Doktorat	2003, Siedlce, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach (ówczesna Akademia Podlaska) Wydział Nauk Ścisłych
doktor nauk chemicznych	Tytuł pracy: "Badanie wpływu struktury cząsteczki na mechanizm i kinetykę procesu wychwytu elektronu" Promotor: Prof. dr hab. Iwona Szamrej-Foryś

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

Adiunkt:	od 2003, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach (ówczesna Akademia Podlaska), Wydział Nauk Ścisłych
Asystent:	1995-2003, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach (ówczesna Wyższa Szkoła Rolniczo-Pedagogiczna w Siedlcach)

4. **Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) *tytuł osiągnięcia naukowego:*

**„Oddziaływanie niskoenergetycznych elektronów z cząsteczkami
o biologicznym znaczeniu”**

b) *spis publikacji stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej:*

(1) I. Bald, **J. Kopyra**, E. Illenberger

- Selective Excision of C5 from D-Ribose in the Gas Phase by Low-Energy Electrons (0–1eV): Implications for the Mechanism of DNA Damage
Angew. Chem. Int. Ed., 45 (2006) 4851
- (2) C. König, **J. Kopyra**, I. Bald, E. Illenberger
Dissociative Electron Attachment to Phosphoric Acid Esters: The Direct Mechanism for Single Strand Breaks in DNA
Phys. Rev. Lett., 97 (2006) 018105
- (3) I. Baccarelli, F.A. Gianturco, A. Grandi, N. Sanna, R.R. Lucchese, I. Bald, **J. Kopyra**, E. Illenberger
Selective Bond Breaking in β -D-Ribose by Gas-Phase Electron Attachment around 8 eV
J. Am. Chem. Soc., 129 (2007) 6269
- (4) I. Bald, **J. Kopyra**, I. Dąbkowska, E. Antonsson, and E. Illenberger
Low energy electron-induced reactions in gas phase 1,2,3,5-tetra-O-acetyl- β -D-ribofuranose: A model system for the behavior of sugar in DNA
J. Chem. Phys., 126 (2007) 074308
- (5) **J. Kopyra**, C. König-Lehmann and E. Illenberger
On the Absolute Value for the Cross Section of Dissociative Electron Attachment (DEA) to the DNA Base Thymine
Int. J. Mass Spectrom., 281 (2009) 89
- (6) **J. Kopyra**, C. König-Lehmann, I. Bald, and E. Illenberger
A Slow Electron Triggers the Loss of Both Cl Atoms from the Anticancer Drug Cisplatin: Implications for Chemoradiation Therapy
Angew. Chem. Int. Ed., 48 (2009) 7904
- (7) **J. Kopyra**, H. Abdoul-Carime
Dissociation of Gaseous Zwitterion Glycine-Betaine by Slow Electrons
J. Chem. Phys., 132 (2010) 204302
- (8) I. Baccarelli, I. Bald, F.A. Gianturco, E. Illenberger, **J. Kopyra**
Electron-induced damage of DNA and its components: Experiments and theoretical models at the nanoscale
Physics Reports, 508 (2011) 1
- (9) **J. Kopyra**
Electron attachment to the N-substituted amino acids N-methylglycine and N-methylalanine: Effective cleavage of the N-C α bond at sub-excitation energies

Chem. Phys. Lett., 533 (2012) 87

- (10) **J. Kopyra**, C. König-Lehmann, E. Illenberger
Low Energy Electron Attachment to N-Acetylglycine
Chem. Phys. Lett., 550 (2012) 47
- (11) **J. Kopyra**, I. Szamrej, H. Abdoul-Carime, B. Farizon, M. Farizon
Decomposition of methionine by low energy electrons
Phys. Chem. Chem. Phys., 14 (2012) 8000
- (12) **J. Kopyra**
Low Energy Electron Attachment to the Nucleotide Deoxycytidine Monophosphate: Direct Evidence for the Molecular Mechanisms of Electron-Induced DNA Strand Breaks
Phys. Chem. Chem. Phys., 14 (2012) 8287
- (13) **J. Kopyra**, C. König-Lehmann, E. Illenberger
Electron attachment to the dipeptide alanyl-glycine
Chem. Phys. Lett., 578 (2013) 54.

c) *omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:*

Wstęp

Ekspozycja organizmów żywych na działanie wysokoenergetycznego promieniowania może prowadzić do zmian w ekspresji genowej i/lub transformacji nowotworowych. W pierwszym przypadku tylko potomkowie narażonej osoby mogą odczuwać skutki takich zmian. Niezależnie od efektów, jakie wywołuje promieniowanie jonizujące, jest ono bardzo powszechnie stosowane w medycynie między innymi w radioterapii, która jest jedną z częściej stosowanych metod w terapii nowotworowej.

Poznanie i opis efektów fizycznych i chemicznych wywołanych działaniem wysokoenergetycznego promieniowania na materiał biologiczny stanowi w dalszym ciągu ważny problem aktualnych badań. Oddziaływanie promieniowania (np. fotonów o energii w zakresie MeV) z cząsteczkami nie może w sposób *bezpośredni* prowadzić do rozerwania wiązań chemicznych. Podstawowym procesem jest jonizacja i wzbudzenie cząsteczek. W wyniku przekazania energii wzdłuż toru cząstki powstają jony, cząsteczki wzbudzone oraz rodniki. Powszechnie przyjmuje się, że to powstałe wtórne produkty (elektrony, jony, rodniki) są odpowiedzialne za późniejsze reakcje chemiczne. Wśród tych produktów

elektrony produkowane są z niezwykle dużą wydajnością tj. około $10^4/1$ MeV z początkową energią w zakresie do kilkudziesięciu eV [1]. Elektrony te, zwane wtórnymi, mogą powodować dalsze procesy jonizacji bądź też ulegać rozproszeniom nieelastycznym na cząsteczkach medium, zanim (w czasach rzędu pikosekund) ulegną solwatacji, tym samym stając się chemicznie mało reaktywnymi indywiduami.

Na podstawie eksperymentów przeprowadzonych przez Léona Sanche'a i współpracowników jednoznacznie wykazano, że bombardowanie plazmidowego DNA elektronami o energiach poniżej progu jonizacji makromolekuły (<10 eV) może powodować powstanie pęknięć łańcucha DNA (zarówno pojedynczonicowych (single strand breaks, SSBs), jak i podwójnoniciowych (double strand breaks, DSBs)) [2]. Co więcej, wykazano, że SSBs mogą powstawać w bardzo niskim obszarze energii (0–3 eV) [3]. Obserwacje te zainicjowały szereg badań, bowiem do tej pory uważano, że tylko elektrony o energiach powyżej progu jonizacji mogą przyczyniać się do uszkodzeń DNA. Ponieważ wydajność pęknięć nici wykazywała rezonansowy charakter w funkcji energii elektronów, sugerowano, że rezonansowy dysocjacyjny wychwyty elektronów (dissociative electron attachment (DEA)) w określonych miejscach/komponentach DNA może stanowić pierwszy etap procesu prowadzącego do pęknięcia nici. Jak zostanie pokazane bardziej szczegółowo w Rozdziałach 1 i 2, proces DEA może w wyniku przyłączenia elektronów o energiach zbliżonych do 0 eV prowadzić do rozerwania wiązań chemicznych z zaskakująco dużą efektywnością.

Niniejsza praca dotyczy reakcji wywoływanych przez niskoenergetyczne elektrony (low energy electrons, LEEs) w komponentach DNA. Badanie mechanizmów prowadzących do uszkodzeń DNA w wyniku przyłączenia elektronów wymaga przeprowadzenia eksperymentów dla pojedynczych komponentów makromolekuły i konsekwentnego przejścia od pojedynczych komponentów do bardziej złożonych układów. Istotnym problemem jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, które (i w jakim stopniu) właściwości charakterystyczne dla pojedynczych komponentów zachowane są w przypadku bardziej złożonych układów. W związku z tym, prezentowane w pracy wyniki dotyczą pojedynczych komponentów DNA/RNA, tj. reszta cukrowa i fosforanowa lub ich odpowiednie analogi [H1-H6]. W kolejnym zaś etapie przedstawione są wyniki uzyskane dla nukleotydu 2'-deoksycytydino-5'-monofosforanu [H7]. Biorąc pod uwagę wcześniejsze wyniki doświadczalne dysocjacyjnego wychwyty elektronu przez komponenty DNA, możliwe będzie zaproponowanie mechanizmu tworzenia SSBs wywoływanych przez niskoenergetyczne elektrony.

In vivo DNA związane jest z cząsteczkami wody i białek, pojawia się zatem pytanie dotyczące roli tych związków w uszkodzeniach DNA. Podczas gdy, rola wody i rodnika OH, produktu jej radiacyjnego rozkładu, w uszkodzeniach makromolekuły jest znana i udokumentowana w licznych pracach naukowych i przeglądowych [4,5], rola białek, w szczególności ich wrażliwość na działanie LEEs, jest znacznie słabiej określona. Ponieważ białka składają się z aminokwasów, ich wrażliwość względem LEEs ma zasadnicze znaczenie w kontekście uszkodzeń materiału biologicznego wywołanych promieniowaniem jonizującym [H8-H12]. Należy zauważyć, że uszkodzenia DNA powodowane przez reaktywne produkty generowane w jego najbliższym otoczeniu (tj. woda i białka) nazywane są *uszkodzeniami pośrednimi* w przeciwieństwie do *bezpośrednich uszkodzeń*, które wynikają z depozycji energii w DNA.

W radioterapii głównym problemem jest nieselektywna ekspozycja tkanek nowotworowych na działanie promieniowania, w związku z czym uszkodzeniu ulegają również zdrowe komórki. Stosowaną strategią w celu zminimalizowania skutków ubocznych jest wykorzystanie radiouczulaczy lub zastosowanie chemioterapii. Chemioterapia polega na podaniu leku, przykładowo cisplatyny, która po aktywacji wiąże się z DNA tworząc addukty cisplatyna-DNA hamujące replikację. Łączne stosowanie cytostatyku i promieniowania może mieć wpływ na proces aktywacji leku przeciwnowotworowego [H13], dzięki czemu możliwa jest aplikacja niższych dawek leku i bardziej ukierunkowane jego działanie. Oczywistym jest, że warunkiem stosowania bardziej skutecznych i ukierunkowanych strategii w radioterapii jest zrozumienie podstawowych procesów na poziomie molekularnym.

Niniejsza praca obejmuje następujące zagadnienia:

- 1 Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez komponenty DNA/RNA
 - 1.1 Identyfikacja jonów fragmentarycznych powstających w wyniku wychwyty elektronu przez cząsteczkę cukru lub jej analog. Selektowne rozerwanie wiązania indukowane wychwytem elektronu
 - 1.2 Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez resztę fosforanową: ester dibutyłowy oraz ester trietyłowy kwasu fosforowego
 - 1.3 Przekrój czynny na wychwyty elektronów przez tyminę
 - 1.4 Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez nukleotyd (2'-deoksycytidyna-5'-monofosforan)
- 2 Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez aminokwasy
 - 2.1 Aminokwasy w formie kanonicznej

2.2 Aminokwasy w formie jonu obojnego

3 Oddziaływanie elektronów z cisplatyną

Wychwyty elektronów przez cząsteczki. Metoda skrzyżowanych wiązek

Technika skrzyżowanych wiązek elektron-cząsteczka (*beam*) jest podstawową metodą stosowaną w badaniach procesów wychwyty elektronów przez cząsteczki w fazie gazowej. W przypadku oddziaływania niskoenergetycznych elektronów (<12 eV) z cząsteczkami, istotnym procesem jest jego przyłączenie do cząsteczki i utworzenie *tymczasowego* (lub *przejściowego*) (transient negative ion, TNI) jonu ujemnego. Określenie *tymczasowy* i/lub *przejściowy* wynika z faktu, że jon molekularny powstający w procesie wychwyty elektronu jest niestabilny ze względu na autojonizację. Jest to związane z tym, że energetycznie leży powyżej cząsteczki obojętnej. Aby zatem mógł zostać utworzony stabilny jon molekularny, TNI musi ulec stabilizacji, przykładowo w zderzeniu z inną cząsteczką środowiska, co jest możliwe w eksperymentach wysokociśnieniowych. Warunkiem istnienia M^- jako termodynamicznie stabilnego tworzywa jest dodatnia wartość powinowactwa elektronowego cząsteczki M. W czasie życia TNI może ulec rozpadowi z utworzeniem jonu fragmentarycznego i jednego lub więcej fragmentów obojętnych. Proces ten nazywany jest dysocjacyjnym wychwytem elektronów (dissociative electron attachment, DEA). Jest on niezwykle istotny, ponieważ może prowadzić do fragmentacji cząsteczek w wyniku przyłączenia elektronów o bardzo niskich energiach (poniżej odpowiedniej energii wiązania). Jak zostanie szczegółowo omówione w dalszej części tego rozdziału, metoda *beam* dostarcza informacji zarówno o energii rezonansów jak i reakcjach fragmentacji TNI.

Zderzenie elektronu z cząsteczką może prowadzić do jej jonizacji lub wzbudzenia. Czas oddziaływania elektronu z cząsteczką jest krótki i odpowiada przejściu elektronu o danej energii na odcinku równym fizycznemu rozmiarowi cząsteczki. Dla energii termicznych (300 K, co odpowiada energii elektronów 26 meV) elektron potrzebuje około 10^{-16} s, aby przebyć dystans 3×10^{-10} m (3 Å). W określonych warunkach (energia i moment pędu nadmiarowego elektronu) oddziaływanie to może prowadzić do przyłączenia elektronu



gdzie nadmiarowy elektron przebywa znacznie dłużej w sąsiedztwie cząsteczki M niż czas samego zderzenia. W klasycznym ujęciu elektron krąży wokół cząsteczki przez pewien czas i może zostać zlokalizowany na najniższym wolnym orbitalu molekularnym (LUMO)

cząsteczki. Jak wynika z równania (1), wychwyt elektronu jest procesem *rezonansowym* i reprezentuje przejście elektronu i cząsteczki ze stanu kontinuum ($M + e$), w którym oba indywidua znajdują się w nieskończonej odległości od siebie, do stanu dyskretnego jonu cząsteczkowego $M^{\#-}$. Symbol # oznacza przejściowy jon ujemny dla odróżnienia pomiędzy jonem ujemnym w stanie podstawowym (M^-). Z tego też powodu określenia przejściowy (TNI) i rezonansowy jon ujemny używane są zamiennie. Odmianą sytuację mamy w przypadku jonizacji lub wzbudzenia, które nie są procesami rezonansowymi. Innymi słowy, proces jonizacji lub wzbudzenia możliwy jest dla każdej energii elektronów powyżej progu energetycznego odpowiedniego procesu, podczas gdy wychwyt elektronów możliwy jest wyłącznie dla odpowiednich (określonych) energii elektronów.

Jak zostało wcześniej wspomniane, TNI powstający w wyniku wychwyty elektronu reprezentuje dyskretny stan kwantowy reprezentowany przez cząsteczkę obojętną i elektron w nieskończonej odległości. Stany takie nazywane są również stanami quasi-dyskretnymi, ponieważ mają ograniczony czas życia ze względu na utratę nadmiarowego elektronu, tj.:



gdzie e_s^- jest oderwanym lub rozproszonym elektronem. Proces (2) nazywany jest autojonizacją. Zgodnie z zasadą nieoznaczoności Heisenberga ograniczony czas życia TNI związany jest z niepewnością energii i określony zależnością

$$\Gamma \approx h/\tau \quad (3)$$

gdzie h jest stałą Plancka a τ czasem życia ze względu na autojonizację. Zależnie od energii emitowanych elektronów, proces autojonizacji może prowadzić do odtworzenia cząsteczki obojętnej albo w stanie podstawowym albo wzbudzonym oscylacyjnie. Cały proces opisany równaniami (1) i (2) nazywany jest rozpraszaniem rezonansowym. W sytuacji kiedy energia (ε) emitowanego elektronu odpowiada jego energii początkowej ($\varepsilon(e_s^-) = \varepsilon(e^-)$) mamy do czynienia z rezonansowym elastycznym rozpraszaniem. Natomiast wtedy, kiedy $\varepsilon(e_s^-) < \varepsilon(e^-)$ mamy do czynienia z rezonansowym rozpraszaniem nieelastycznym. Ten ostatni proces jest w rzeczywistości bardzo skutecznym sposobem oscylacyjnego wzbudzania cząsteczek. W przypadku procesu bezpośredniego rozpraszania masa elektronu jest zbyt mała, aby doprowadzić do oscylacyjnego wzbudzenia cząsteczki. W zderzeniach rezonansowych, elektron tymczasowo zajmuje orbital molekularny (najczęściej o charakterze antywiązącym) przez co wywiera siły na jądro prowadząc do efektywnego oscylacyjnego wzbudzenia. Należy podkreślić, że w przypadku cząsteczek

wieloatomowych szerokość rezonansu jest raczej podyktowana przejściem w obszarze Francka-Condon'a a nie ograniczonym czasem życia TNI.

Przejściowy jon ujemny (TNI) może również ulegać reakcji dysocjacji z utworzeniem trwałych fragmentów: obojętnego (R) i obdarzonego ładunkiem ujemnym (X^-), zgodnie z reakcją:



Proces (opisany reakcjami 1 i 4) nazywany jest dysocjacyjnym wychwytem elektronów (DEA). Próg energetyczny (lub entalpia reakcji ΔH_0) tego procesu prowadzącego do utworzenia wspomnianych trwałych fragmentów (R i X^-) opisuje równanie:

$$\Delta H_0 = D(R-X) - EA(X) \quad (5a)$$

gdzie $D(R-X)$ jest energią wiązania R-X (lub entalpią wiązania), natomiast $EA(X)$ jest powinowactwem elektronowym fragmentu X. Entalpia reakcji może być, w sposób równoważny, wyrażona poprzez standardowe ciepła tworzenia (ΔH_f)

$$\Delta H_0 = \Delta H_f(R) + \Delta H_f(X^-) - \Delta H_f(RX) \quad (5b)$$

gdzie $\Delta H_f(X^-) = \Delta H_f(X) - EA(X)$, natomiast $RX = M$.

Szczególnie wysokimi wartościami powinowactwa elektronowego charakteryzują się atomy chlorowców. W przypadku Cl wartość ta wynosi 3.6 eV i przewyższa wartość typowej energii wiązania C-Cl, która wynosi około 3.0 - 3.4 eV. Oznacza to, że wychwyty elektronów o energii zbliżonej do 0 eV może prowadzić do dekompozycji chloropochodnych węglowodorów, z utworzeniem jonu Cl^- i odpowiedniego rodnika, a sam proces wychwyty jest procesem egzotermicznym.

W metodzie *beam* wiązka elektronów o zdefiniowanej ale zmiennej energii przecina wiązkę molekularną w warunkach pojedynczych zderzeń. Jony ujemne powstające w procesie wychwyty elektronów przyspieszane są niewielkim polem elektrycznym do kwadrupolowego spektrometru mas, analizowane i rejestrowane metodą zliczania pojedynczych impulsów. W warunkach eksperymentalnych elektron przecinający wiązkę badanych cząsteczek ma znikome szanse na to aby zderzyć się z więcej niż jedną cząsteczką. Podobnie jony ujemne powstające w procesie wychwyty elektronów nie ulegają zderzeniom z cząsteczkami obojętnymi zanim dotrą do spektrometru mas. Czas w jakim jony ujemne docierają do spektrometru jest rzędu μs . Jeśli w tym czasie TNIs ulegną rozpadowi do jonów fragmentarycznych, odpowiednie jony zostaną zarejestrowane. W przeciwnym razie, kiedy elektron zostanie wyemitowany (autojonizacja) nie rejestrujemy żadnego sygnału. TNIs zwykle charakteryzują się krótkim czasem życia, albo

ze względu na autojonizację, albo ze względu na dysocjację. Bezpośrednia dysocjacja wzdłuż odpychającej krzywej energii potencjalnej przebiega w czasach rzędu femtosekund, natomiast reakcje dekompozycji, którym towarzyszy przegrupowanie w obrębie TNI zachodzą w skali pikosekundowej. Przedstawiona skala czasowa procesów wskazuje iż w eksperymencie *beam* rejestruje się jony fragmentarycznego powstające w procesie dysocjacyjnym. Istnieją jednak przypadki, kiedy wychwyt elektronu prowadzi do utworzenia stabilnego (długożyciowego) jonu molekularnego. Przykładem jest chociażby SF₆, który wychwytuje elektrony o energii ≈0 eV w procesie niedysocjacyjnym prowadząc do utworzenia jonu SF₆⁻.

Standardowa procedura pomiaru w metodzie *beam* polega na przygotowaniu spektrometru do pomiaru jonu o wybranej masie i rejestracji sygnału w funkcji energii elektronów. W wyniku takiego pomiaru otrzymujemy krzywą wydajności jonu, która przedstawia względny przekrój czynny na wychwyt dla danej reakcji.

W przypadku cząsteczek wieloatomowych (M) możemy mieć zatem do czynienia z sytuacją, którą przedstawiają poniższe reakcje:



Elektron o określonej energii przyłączany jest przez cząsteczkę prowadząc do utworzenia TNI, który może ulegać rozpadowi zgodnie z jedną z przykładowo podanych reakcji. Rejestrując wydajności jonów dla różnych fragmentów otrzymujemy krzywe wydajności o zbliżonym kształcie, bowiem jony te (X⁻, Y⁻ i Z⁻) powstają w wyniku dekompozycji tego samego TNI. Jednakże możemy tutaj obserwować znaczne różnice względnych intensywności oraz do pewnego stopnia różnice kształtu krzywych wydajności co wynika z odmiennych mechanizmów dekompozycji TNI. Należy podkreślić, że w badaniach metodą *beam* zazwyczaj wykonuje się pomiary w zakresie energii od wartości bliskich 0 eV do energii poniżej progu jonizacji (tj. 0-12 eV) identyfikując tym samym szereg rezonansów.

Poniżej zostaną zaprezentowane wyniki dysocjacyjnego wychwytu elektronów przez związki istotne z biologicznego punktu widzenia. W wielu przypadkach, takich jak cząsteczki cukrów oraz aminokwasy, proces wychwytu prowadzi do utworzenia niskoenergetycznych stanów rezonansowych o energii zbliżonej do 0 eV.

1 Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez komponenty DNA/RNA

Jak wspomniano powyżej, wysokoenergetyczne promieniowanie generuje w medium dużą ilość elektronów balistycznych o początkowej energii do kilkudziesięciu eV. Wydaje się, że te balistyczne (wtórne) elektrony odpowiedzialne są za inicjowanie reakcji prowadzących do uszkodzenia materiału genetycznego.

Efekty oddziaływania niskoenergetycznych elektronów ze składnikami DNA zostały omówione w pracy przeglądowej [H1]. Pozycja ta stanowi podsumowanie wyników własnych i literaturowych (zarówno eksperymentalnych jak i teoretycznych) uzyskanych dla komponentów DNA w fazie gazowej począwszy od pojedynczych składników budujących nukleotydy do nukleozydów. Wyniki te zostały zestawione i przedyskutowane w kontekście danych uzyskanych w innych stanach skupienia m.in. w kroplach helowych oraz w fazie skondensowanej. Poniżej wyniki badań własnych zostaną przedstawione w sposób bardziej szczegółowy.

1.1 Identyfikacja jonów fragmentarycznych powstających w wyniku wychwyty elektronu przez cząsteczkę cukru lub jej analog. Selekttywne rozerwanie wiązania indukowane wychwytem elektronu

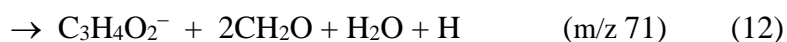
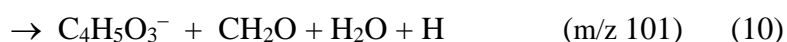
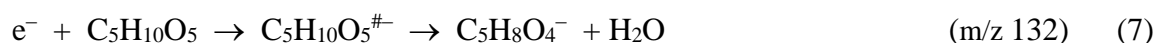
Grupa cukrowa jest centralną częścią nukleotydu, która wiąże dwie sąsiednie reszty fosforanowe poprzez wiązania C'5-O-P i C'3-O-P. Poza tym, grupa ta łączy się z jedną z czterech zasad azotowych i tym samym, poprzez tworzenie par zasad, umożliwia utworzenie dwuniciowej cząsteczki DNA. Badanie reakcji wychwyty niskoenergetycznych elektronów przez grupę cukrową jest szczególnie istotne, bowiem przyłączenie elektronu może prowadzić do pęknięcia wiązania N-glikozydowego, co z kolei powoduje utratę zasady azotowej a tym samym destabilizację szkieletu DNA. Rozerwanie jednego z wiązań estrowych może prowadzić do pojedynczoniciowego pęknięcia DNA. Podczas gdy pojedynczoniciowe pęknięcia mogą być łatwo naprawione, nieodwracalne utworzenie podwójnoniciowych pęknięć może prowadzić do śmierci komórki lub jej transformacji w komórkę nowotworową.

Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez rybozę

Do chwili obecnej opublikowanych jest tylko kilka prac eksperymentalnych na temat oddziaływania niskoenergetycznych elektronów z izolowanymi cząsteczkami cukrów, takimi jak deoksyryboza [6], ryboza [H2,7] oraz fruktoza [8,9]. Jak wynika z doniesień literaturowych, wszystkie te związki wykazują zbliżoną fragmentację. Dotyczy

to między innymi utraty jednej lub dwóch cząsteczek wody z TNI (transient negative ion) w wyniku czego powstają odpowiednie jony fragmentaryczne. Dotychczasowe wyniki badań uzyskane dla deoksyrybozy i fruktozy nie pozwalają określić fragmentu (miejsca) cząsteczki z którego odpowiednie jony są generowane. Aby określić to miejsce wykonaliśmy badania dla rybozy ($C_5H_{10}O_5$) i trzech izotopowo znaczonych cząsteczek, mianowicie rybozy znaczonej węglem ^{13}C w pozycji C1 (1- ^{13}C -ryboza), rybozy znaczonej węglem ^{13}C w pozycji C5 (5- ^{13}C -ryboza) oraz rybozy podstawionej deuterem w pozycji C1 (C,1-D-ryboza). Zanim przedstawione zostaną wyniki badań dla tych związków należy wspomnieć, że w fazie gazowej ryboza występuje głównie w formie pyranozowej (sześciocząłowy układ pierścieniowy) [10,11].

Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez rybozę i jej izotopowo znaczone analogii prowadzi do utworzenia licznych jonów fragmentarycznych w bardzo niskim obszarze energii elektronów ($< 1eV$). Kanały fragmentacji TNI w przypadku rybozy zostały zestawione poniżej [H2]:



gdzie $C_5H_{10}O_5^{\#-}$ oznacza przejściowy jon ujemny (TNI). Główne reakcje dekompozycji TNI związane są z utratą jednej lub dwóch cząsteczek wody (Rysunek 1 w pracy [H2]). Ponadto rejestrowano wiele innych jonów fragmentarycznych powstających ze znaczącą wydajnością (Rysunki 2 i 3 w pracy [H2]). Utrata cząsteczek wody prawdopodobnie prowadzi do utworzenia anionów o strukturze cyklicznej, podczas gdy inne fragmenty powstają w wyniku rozkładu pierścienia cukrowego. W naszym eksperymencie rejestrujemy wyłącznie jony ujemne. Z tego względu obojętne produkty zaproponowane w reakcjach 7-14 odpowiadają najbardziej prawdopodobnym strukturom. Zostały one zaproponowane na podstawie wyników eksperymentu MALDI [12]. Stechiometryczne przyporządkowanie struktur jonom fragmentarycznym w niektórych przypadkach jest jednak niejednoznaczne, przykładowo fragmentowi o $m/z \ 101$ można przyporządkować

także strukturę $C_5H_9O_2^-$. Jak zostanie pokazane w dalszej części tego paragrafu, eksperymenty z izotopowo znaczoneymi cząsteczkami dostarczają dodatkowych informacji na temat fragmentacji rybozy. Umożliwiają przede wszystkim określenie fragmentu cząsteczki, który zaangażowany jest w proces fragmentacji.

Utrata cząsteczek wody

W przypadku rybozy utrata jednej lub dwóch cząsteczek wody prowadzi do powstania jonów obserwowanych odpowiednio przy m/z 134 i 114. Tak jak się spodziewano, dla izotopowo znaczonego analogów $1-^{13}C$ -rybozy i $5-^{13}C$ -rybozy fragmenty obserwowane są przy m/z 133 i 115 (Rysunek 1 w pracy [H2]). Zaskakujące było jednak to, że jony fragmentaryczne w przypadku deuterowanej rybozy (C,1-D-ryboza) również rejestrowane były przy m/z 133 i 115. Oznacza to, że wiązanie C1-D w C,1-D-rybozie nie ulega rozerwaniu w reakcji prowadzącej do utraty cząsteczek wody.

Dalsze fragmenty powstające w wyniku rozkładu pierścienia cukrowego

Dekompozycja pierścienia cukrowego związana jest przede wszystkim z utworzeniem następujących jonów fragmentarycznych $C_4H_5O_3^-$ (m/z 101), $C_3H_4O_2^-$ (m/z 72), $C_2H_3O_2^-$ (m/z 59) oraz $HCOO^-$ (m/z 45). Jednoznaczne przypisanie struktur powyższym fragmentom zostało osiągnięte przy użyciu izotopowo znaczonego cząsteczek. Jak pokazano dla przykładowych fragmentów rejestrowanych przy m/z 101 i 102 (Rysunek 2 w pracy [H2]) takie same masy obserwowano w przypadku rybozy oraz rybozy znaczonej węglem ^{13}C w pozycji C5 ($5-^{13}C$ -ryboza). Dla kolejnych dwóch izotopomerów sygnały przesunięte są o jedną jednostkę masy, tj. do m/z 102 i m/z 103, odpowiednio. Świadczy to o tym, że reakcja przebiega wyłącznie poprzez oderwanie jednostek zawierających atom węgla w pozycji C5, podczas gdy atomy ^{13}C i D w pozycji C1 pozostają w strukturze jonu. Analogiczną sytuację obserwowano przy niższych masach, należy tutaj jednak wspomnieć, że proces fragmentacji przebiegał z niższą selektywnością. W oparciu o uzyskane wyniki zaproponowano schemat reakcji sekwencyjnej i/lub równoległej dekompozycji przejściowego jonu ujemnego powstającego w procesie wychwytu niskoenergetycznych elektronów przez rybozę (Schemat 1 w pracy [H2]).

Ryboza ulega dekompozycji także w obszarze wyższych energii 5-9.5 eV [H3]. W tym przypadku obserwujemy fragmenty przy m/z 72 i 59 oraz jon OH^- . Okazuje się, że reakcja dekompozycji TNI w tym obszarze energii nie jest tak selektywna jak to miało miejsce w przypadku niskoenergetycznych TNI (poniżej 1 eV). Taka sytuacja została przedstawiona na Rysunku 3 w pracy [H3], który przedstawia krzywe wydajności jonów rejestrowanych przy m/z 59 i 60. Dla rybozy oraz $5-^{13}C$ -rybozy sygnał pojawia się

wyłącznie przy m/z 59, podczas gdy dla $1\text{-}^{13}\text{C}$ -rybozy i deuterowanej rybozy (C,1-D-ryboza) intensywności obu fragmentów przy m/z 59 i 60 są porównywalne. Wyniki te wskazują na brak wyraźnej tendencji do lokalizacji nadmiarowego elektronu na węglu w pozycji C1 w zakresie wyższych energii elektronów.

Mechanizm reakcji dysocjacyjnego wychwytu elektronu

Rezonanse w obszarze energii 0-1 eV. Mechanizmem, który zwykle ma miejsce w procesach wychwytu elektronów o niskich energiach jest rezonans kształtu (shape-resonance). W procesach tych wychwycony elektron zajmuje najniższy wolny orbital molekularny (LUMO) cząsteczki, zwykle orbital antywiązący. Proces ten nie wpływa na konfigurację pozostałych elektronów. W przypadku nasyconych monosacharydów jedynymi dostępnymi orbitalami są antywiązące orbitale typu sigma, σ^* . Energia tych orbitali jest jednak zbyt wysoka, aby były one osiągalne przez niskoenergetyczne elektrony (< 1 eV). Wynika to z danych uzyskanych dla alkoholi i eterów [13]. Stany rezonansowe typu shape-resonance w przypadku alkoholi zawierających jedną grupę hydroksylową, takich jak metanol czy etanol, obserwowane były przy energiach około 3 eV i zostały przypisane orbitalom typu $\sigma^*_{\text{O-H}}$. Charakteryzują się jednak niską wydajnością. Oczekuje się, że intensywność rezonansów będzie zwiększała się wraz z rozmiarami cząsteczek ale przede wszystkim z liczbą grup hydroksylowych. Jednocześnie powinna obniżać się energia rezonansów. Dla *cis*-1,2-cyklopentanodiolu energia pojawienia się rezonansu jest w dalszym ciągu zbyt wysoka i wynosi 1.94 eV [13]. Możemy założyć, że tendencja obniżania energii rezonansów utrzyma się dla monosacharydów zawierających trzy lub cztery grupy hydroksylowe, tj. dla cząsteczek deoksyrybozy i rybozy. Pomimo tego, energia orbitala $\sigma^*_{\text{O-H}}$ może być wciąż zbyt wysoka, aby był on osiągnięty przez elektrony o energiach bliskich 0 eV.

Innym możliwym mechanizmem w przypadku tzw. rezonansów progowych (powstających przy energiach bliskich 0 eV) jest tworzenie oscylacyjnie wzbudzonych rezonansów Feshbacha (vibrational Feshbach resonances, VFRs), które powstają dzięki pośrednictwu stanów związanych dipolowo (dipole bound (DB) states). Stany związane dipolowo powstają w wyniku oddziaływaniu nadmiarowego elektronu z polarną cząsteczką. Aby jednak polarna wieloatomowa cząsteczka mogła związać nadmiarowy elektron jej moment dipolowy powinien być większy niż 2D [14,15]. Z obliczeń wykonanych dla rybozy w jej formie pyranozowej wynika, że charakteryzuje się ona momentem dipolowym wynoszącym 2.15 D (średnia ważona wartości momentów dipolowych wyznaczonych dla najbardziej stabilnych konformerów) [16]. Wartość ta jest

wystarczająco wysoka, aby mógł być utworzony stan związany dipolowo. Stan DB może z kolei sprzęgać się ze stanem walencyjnym prowadząc do dysocjacji cząsteczki. W rzeczywistości taki mechanizm został przewidziany przez Sommerfelda [17,18] dla fruktozy przy założeniu, że bariera dla wewnątrz-cząsteczkowego przeniesienia nadmiarowego ładunku jest odpowiednio niska.

Rezonanse w obszarze energii 5.0-9.5 eV. W wyższym zakresie energii, wychwyty nadmiarowego elektronu zazwyczaj odbywa się zgodnie z tzw. rdzeniowo wzbudzonym rezonansem kształtu (core excited resonance) (tj. tworzenie tzw. rezonansów dwóch cząstek z dwoma elektronami na normalnie pustym orbitalu molekularnym i jednej dziury na normalnie zajętych orbitalach). W tym procesie elektron przekazuje część swojej energii na wzbudzenie elektronowe cząsteczki. Spowolniony elektron zostaje następnie spułapkowany w polu potencjału pojawiającym się na skutek wzajemnego przyciągania elektronu i elektronowo wzbudzonej cząsteczki.

Nie można tutaj pominąć ewentualnego udziału wysokoenergetycznych rezonansów kształtu. Ostatnie obliczenia teoretyczne dla rybozy w formie pyranozowej przewidują bowiem istnienie czterech rezonansów kształtu w zakresie energii 7.98 - 9.49 eV (Tabela 3, Rysunki 7 i 8 w pracy [H3]). Pozycje tych rezonansów są wprawdzie nieco różne od obserwowanych eksperymentalnie, jednak ze względu na ich znaczną szerokość mogą z łatwością tłumaczyć wyniki eksperymentalne. Ponieważ w obliczeniach nie uwzględniono wzbudzenia elektronowego cząsteczki stąd też możemy przyjąć, że w obszarze energii 5.0-9.5 eV mamy do czynienia zarówno z rezonansami kształtu jak i rdzeniowo wzbudzonymi rezonansami kształtu.

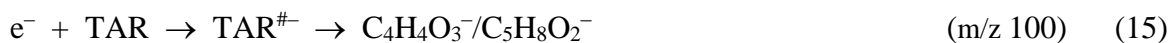
Wychwyty elektronów przez tetra-acetylorambozę

Schemat reakcji (7-14) pokazuje, że ryboza jest bardzo podatna na ataki niskoenergetycznych elektronów. Dekompozycja przebiega w sposób selektywny i związana jest z utratą jednostek zawierających atom węgla C5. Ryboza w fazie gazowej występuje jednak w formie pyranozowej. Tak więc, w celu pełniejszego zrozumienia zachowania grupy cukrowej w DNA/RNA wykonaliśmy pomiary dla 1,2,3,5-tetra-*O*-acetylo- β -D-rybofuranozy (tetra-acetyloramboza, TAR). Związek ten charakteryzuje się strukturą furanozową (podobnie jak grupa cukrowa w DNA/RNA), w którym zarówno grupa fosforanowa jak i zasada azotowa naśladowane są przez grupy acetylowe. Ponadto należy tutaj podkreślić, że związek ten pozbawiony jest grup hydroksylowych, które

zgodnie z wynikami badań elektronowej spektroskopii transmisyjnej mogą znacząco wpływać na wartość przekroju czynnego na wychwytywanie elektronu [19].

Dominującym jonem fragmentarycznym powstającym w procesie wychwytywania elektronów przez tetra-acetyloribozę jest jon m/z 59, zidentyfikowany jako zamkniętopowłokowy jon octanowy. Jon ten obserwowany jest w trzech obszarach energetycznych (Rysunek 2 w pracy [H4]): przy energii bliskiej 0 eV, w obszarze energii 1-3 eV oraz ze znacznie niższą wydajnością w zakresie 7-10 eV. Bezpośrednią drogą jego powstania jest pęknięcie jednego z wiązań C-O w pozycji C1, C2, C3 lub C5.

W przypadku jonów o wyższych masach sytuacja nie jest tak oczywista. Najprawdopodobniej powstają one w wyniku strukturalnego i elektronowego przegrupowania w obrębie TNI, stąd też przypisanie im jednoznacznych struktur stechiometrycznych nie jest możliwe. Jedną grupę stanowią tutaj jony fragmentaryczne obserwowane przy energii około 0 eV z dodatkowymi rezonansami o znacznie niższych wydajnościach w zakresie 7-11 eV. Do grupy tej należą jony rejestrowane przy m/z 100, 84 i 70 (Rysunek 3 w pracy [H4]), którym przypisano następujące struktury stechiometryczne:



W zasadzie wszystkie z wyżej zaproponowanych struktur mogą odpowiadać anionorodnikom o pięcioczłonowym pierścieniu. Kształt i pozycja rezonansów przypominają te, które obserwowano w przypadku rybozy, gdzie dominujące sygnały związane były z utratą jednej lub dwóch cząsteczek wody.

W zakresie energii 1.0-2.5 eV jony fragmentaryczne obserwowano przy m/z 215, 161, 154, 119 i 113 (Rysunek 4 w pracy [H4]). W obszarze tym obliczenia teoretyczne przewidują istnienie trzech rezonansów odpowiednio przy energii 1.83, 1.86 i 2.03 eV. Odpowiadają one rezonansom kształtu z nadmiarowym elektronem zlokalizowanym na orbitalu π^* egzo-cyklicznej grupy karboksylowej (Rysunek 5 w pracy [H4]). Ponieważ w przypadku wcześniej badanych monosacharydów, rybozy i fruktozy, rezonanse w tym obszarze energii nie były obserwowane, stąd takie ich przyporządkowanie wydaje się jak najbardziej uzasadnione.

Wyniki wskazują, że procesy, które inicjowane są przez niskoenergetyczne elektrony w grupie cukrowej mogą odgrywać znaczącą rolę w mechanizmie prowadzącym

do powstania pojedynczych pęknięć nici. Wydaje się, że elektrony mogą być wiązane przez siły dyspersyjne TAR, a rolę odgrywa tutaj zarówno sam pierścień jak i jego podstawniki. W szczególności fragmenty, które są obserwowane w obszarze energii około 0 eV mogą być związane z degradacją pierścienia cukrowego. Niemniej jednak, najbardziej wydajnym fragmentem jest jon octanowy, który powstaje w wyniku rozerwania pojedynczego wiązania C-O. Rozerwanie wiązania C5-O lub C3-O w DNA odpowiadałoby SSB. Z drugiej strony, pęknięcie wiązania C1-O prowadziłoby do utraty zasady. Należy podkreślić iż wychwytywanie elektronów przez TAR prowadzi również do utworzenia rdzeniowo wzbudzonych rezonansów, a tym samym może przyczyniać się do powstania bardziej złożonych uszkodzeń DNA, takich jak DSBs.

1.2 Dysocjacyjny wychwytywanie elektronów przez resztę fosforanową: ester dibutyłowy oraz ester trietyłowy kwasu fosforowego

Pierwsze badania eksperymentalne wychwytywania niskoenergetycznych elektronów przez pochodne kwasu fosforowego przeprowadzone w fazie gazowej obejmowały ester dibutyłowy kwasu fosforowego (dibutylphosphate, DBP) oraz ester trietyłowy kwasu fosforowego (triethylphosphate, TEP). Okazuje się, że oba te związki wychwytywały elektrony w całym badanym zakresie energii 0-10 eV. Dominującą reakcją w przypadku DBP jest utrata obojętnego atomu wodoru, co prowadzi do utworzenia zamkniętopowłokowego jonu $(\text{DBP-H})^-$, który obserwowany jest poprzez niskoenergetyczny rezonans z maksimum wydajności przy 1 eV (Rysunek 2 w pracy [H5]). Odpowiednia reakcja nie była obserwowana w przypadku TEP, co wskazuje, że utrata wodoru w DBP następuje z grupy hydroksylowej. Drugim najbardziej wydajnym fragmentem w przypadku DBP jest jon OH^- , który powstaje w wyniku rozerwania pojedynczego wiązania P-O i pojawia się w bardzo niskim obszarze energii przy około 0.2 eV. Jednakże, najbardziej znaczącą reakcją w kontekście uszkodzenia DNA jest utrata całej (obojętnej) grupy butylowej. Proces ten prowadzi do utworzenia jonu m/z 153 $(\text{DBP-C}_4\text{H}_9)^-$ i obserwowany jest w dwóch obszarach energii pomiędzy 2-4 eV oraz 7-10 eV. Podobny proces miał miejsce w przypadku TEP i związany był z utratą rodnika $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ na skutek pęknięcia wiązania P-O (Rysunek 4 w pracy [H5]). W tym przypadku obserwowano wyłącznie rezonans w obszarze wyższych energii (7-9 eV). Obie reakcje, utrata grupy butylowej oraz rodnika etoksyłowego w przypadku DBP i TEP, odpowiednio, może odpowiadać pęknięciu nici w DNA.

Inną grupę stanowią jony fragmentaryczne, gdzie nadmiarowy ładunek zlokalizowany jest na fragmencie zawierającym atom P. W przypadku DBP do tej grupy jonów należą $(C_3H_7O)P(O)(OH)_2^-$, $H_2PO_3^-$, PO_3^- i PO^- (Rysunek 3 w pracy [H5]). Natomiast w przypadku TEP obserwowano wyłącznie $H_2PO_3^-$ i PO_3^- (Rysunek 4 w pracy [H5], wydajność jonu $H_2PO_3^-$ nie została pokazana). Wszystkie te jony powstają w wyniku złożonych reakcji a ich powstanie związane jest z dysocjacją wielu wiązań.

1.3 Przekrój czynny na wychwyt elektronów przez tyminę

Znajomość bezwzględnych wartości przekrojów czynnych na wychwyt elektronów ma zasadnicze znaczenie dla zrozumienia i modelowania uszkodzeń wywołanych promieniowaniem. W eksperymencie *beam* bezwzględne wartości przekrojów nie mogą być wyznaczone w sposób bezpośredni. Wymagałoby to dokładnej znajomości gęstości gazu, gęstości elektronów w wiązce, a co najważniejsze, prawdopodobieństwa detekcji dla powstających jonów fragmentarycznych. Jedynym zatem sposobem aby uzyskać szacunkowe wielkości bezwzględnych wartości przekrojów czynnych jest porównanie wyników uzyskanych dla badanego związku z wynikami uzyskanymi dla związku referencyjnego, w przypadku którego wartość przekroju czynnego jest dobrze znana (określona innymi technikami).

Należy tutaj podkreślić, że znajomość wartości przekrojów czynnych na (dysocjacyjny) wychwyt elektronów przez zasady azotowe jest niezwykle istotna. Szczególnie jeśli uwzględnimy zaproponowany, na podstawie obliczeń teoretycznych, mechanizm transferu elektronu prowadzący do powstania uszkodzeń pojedynczoniciowych [20,21]. Dla układu modelowego, jakim jest nukleotyd 2'-deoksycytidyna-5'-monofosforan (dCMP), zaproponowano iż proces ten polega na migracji nadmiarowego elektronu z zasady azotowej (zasada działa jak antena, tym samym wiąże niskoenergetyczny elektron tworząc krótko żyjący rezonans) do reszty fosforanowej. Przeniesieniu elektronu towarzyszy rozerwanie wiązania C-O pomiędzy grupą cukrową i fosforanową.

Zasady azotowe, i procesy zachodzące w wyniku przyłączenia niskoenergetycznych elektronów, to najczęściej badane komponenty DNA [22,23,24,25]. Jak wykazano wychwyt elektronu przez te związki w zakresie energii poniżej wzbudzenia elektronowego cząsteczki jest procesem selektywnym nie tylko ze względu na rodzaj pękającego wiązania ale również pozycję tegoż wiązania. W tym obszarze energii najbardziej wydajnym jonem fragmentarycznym jest jon powstający w wyniku utraty

atomu wodoru (M-H)⁻ (gdzie M jest cząsteczką zasady azotowej). Z badań przeprowadzonych dla deuterowanej tyminy przy atomach węgla wynika, że utrata obojętnego atomu H następuje wyłącznie poprzez rozerwanie wiązania N-H [26,27]. Kolejne badania przeprowadzone dla N1-metylowanej tyminy oraz N3-metylowanego uracylu pozwoliły stwierdzić, że utrata wodoru, jak wspomniano wcześniej, jest również selektywna ze względu na pozycję pękającego wiązania. Okazało się, że elektrony o energii 1.0 eV powodują rozerwanie wyłącznie wiązania N1-H, natomiast elektrony o energii 1.8 eV indukują przede wszystkim pęknięcie wiązania N3-H [28].

Pomimo ogromnego zainteresowania badaniami oddziaływania niskoenergetycznych elektronów z zasadami azotowymi, w chwili obecnej znanych jest tylko kilka prac, które dotyczą pomiarów przekroju czynnego na wychwytywanie elektronów. Dwa niezależne eksperymenty przeprowadzone metodą *beam* dla tyminy podają wartości przekroju w zakresie 10^{-15} cm² [26,29] dla głównego rezonansu (T-H)⁻ (gdzie T = tymina) z maksimum wydajności pików przy 1 eV. Wartości te są wartościami względnymi i otrzymano je poprzez porównanie z wartościami przekroju czynnego dla innych związków takich jak SF₆ i CCl₄. Jednocześnie z eksperymentu elektronowej spektroskopii transmisyjnej (electron transmission spectroscopy, ETS) otrzymano wartość 4.7×10^{-19} cm² [30]. Sugerowano, że duża rozbieżność (współczynnik około 2500) pomiędzy wynikami otrzymanymi metodą *beam* i ETS wynika z kondensacji odparowywanej próbki tyminy. Aby określić fizyczne pochodzenie tej rozbieżności przeprowadziliśmy eksperyment dla tyminy wykorzystując zmodyfikowaną aparaturę *beam* (obecnie cały system próżniowy jest równomiernie ogrzewany, co uniemożliwia, a przynajmniej w dużym stopniu ogranicza, kondensację odparowywanej próbki).

Jak wspomniano wcześniej, przekrój czynny dla procesów DEA uzyskuje się poprzez porównanie z wydajnością jonów dla związku referencyjnego o znanym przekroju. W naszych eksperymentach wykorzystano drugi rezonans Cl⁻ dla CHCl₃ o znanej wartości przekroju czynnego wynoszącego 5.68×10^{-16} cm² przy 0.3 eV [31]. Uniknięto zatem kalibracji z wykorzystaniem SF₆, który tworzy jon SF₆⁻ w krytycznym obszarze energii ≈ 0 eV. Na podstawie wykonanych badań otrzymaliśmy wartość średnią przekroju czynnego dla (T-H)⁻ przy 1 eV wynoszącą $7.9 \pm 4 \times 10^{-17}$ cm² [H6].

Obserwowana różnica (współczynnik około 170) jest najprawdopodobniej spowodowana systematycznym błędem popełnianym w obu eksperymentach. W szczególności, może wynikać z zachodzącej w niewielkim stopniu kondensacji

sublimowanej próbki w eksperymencie *beam*, a także z ograniczonego w eksperymencie ETS prawdopodobieństwa neutralizacji jonów $(T-H)^-$ (w przeciwieństwie do kationów T^+). W eksperymencie ETS przekrój czynny reakcji związanej z utratą atomu H określony został poprzez porównanie wydajności rejestrowanych jonów ujemnych $(T-H)^-$ z wydajnością kationów uwzględniając znaną wartość przekroju czynnego procesu jonizacji tyminy. Podsumowując, uważamy, że wartość przekroju czynnego reakcji prowadzącej do powstania $(T-H)^-$ wynosząca $7.9 \times 10^{-17} \text{ cm}^2$ z eksperymentu *beam* [H6] stanowi górną granicę, natomiast wartość przekroju $4.7 \times 10^{-19} \text{ cm}^2$ z eksperymentu ETS stanowi jego dolną granicę.

1.4 Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez nukleotyd (2'-deoksycytidyna-5'-monofosforan)

Jak wspomniano we wstępie, przełomowy eksperyment grupy Sanche'a wykazał, że niskoenergetyczne elektrony o energii poniżej progu jonizacji DNA (7.5-10 eV [32]) mogą wywoływać zarówno SSB jak i DSB [2,3]. Ponieważ profil uszkodzeń w funkcji energii elektronów wykazywał wyraźne struktury rezonansowe, zaproponowano że rezonansowy wychwyty elektronów, który przebiega w poszczególnych komponentach DNA może być pierwszym krokiem prowadzącym do pęknięcia łańcucha DNA.

Zasadniczą kwestią w badaniach biocząsteczek jest pytanie, w jaki sposób właściwości oraz zachowanie pojedynczych cząsteczek zmieniają się kiedy zostają one wbudowane w bardziej złożony układ związany kowalencyjnie. W związku z tym, przeprowadziłam badania dysocjacyjnego wychwyty elektronu przez nukleotyd 2'-deoksycytidyna-5'-monofosforan (dCMP), a otrzymane wyniki porównałam z uzyskanymi wcześniej dla pojedynczych komponentów. Oczekiwałam, że badania reakcji DEA przez nukleotyd dostarczą informacji dotyczących mechanizmu uszkodzeń łańcucha DNA. Ponieważ każdy z komponentów DNA posiada charakterystyczny profil reakcji DEA, badania zależności energetycznych tworzonych jonów dostarczają informacji na temat reakcji konkurencyjnych, takich jak bezpośredni wychwyty elektronów przez komponenty łańcucha DNA lub przyłączenie elektronu do zasady z następującą migracją nadmiarowego elektronu do łańcucha.

Badania teoretyczne zainicjowane wynikami grupy Sanche'a przewidują różne scenariusze uszkodzeń DNA wywołanych przez niskoenergetyczne elektrony. Zgodnie z wynikami grupy z Utah [20,21], która badała fragment DNA składający się z cytozyny, cukru i grupy fosforanowej, wychwyty elektronu następuje na orbital π^* zasady. Elektron

migruje następnie do orbitala σ^* wiązania C-O, co prowadzi do jego rozerwania. Stwierdzono na tej podstawie, że zasada azotowa może być specyficzną ‘anteną’, która wychwytuje elektrony o energii około 1 eV, co ostatecznie prowadzi do powstania SSB w obszarze energii poniżej wzbudzenia elektronowego. Dalsze obliczenia tej grupy wskazują, że przyłączenie elektronu o energii 2-3 eV może następować bezpośrednio do komponentów łańcucha DNA [33]. W tym przypadku elektron lokalizowany byłby bezpośrednio na reszcie fosforanowej indukując SSB poprzez rozerwanie wiązania C-O w pozycji 3’ lub 5’ i utworzenia anionorodnika zlokalizowanego na atomie fosforu. Z kolei, obliczenia Li i współpracowników [34] przewidują, że elektrony o energii bliskiej 0 eV mogą być przyłączane do łańcucha DNA co także prowadzi do pęknięcia nici. Rozerwanie wiązania C-O wymaga jednak pokonania bariery energetycznej wynoszącej około 0.43 eV. Innym mechanizmem prowadzącym do rozerwania wiązania C-O pomiędzy resztą fosforanową i cukrową zaproponowanym przez Dąbkowską i współpracowników [35] jest przeniesienie protonu z grupy cukrowej do cytozyny, czemu towarzyszy przyłączenie elektronu preferencyjnie do atomu węgla w pozycji C6 zasady azotowej. W tym przypadku bariera energetyczna dla przeniesienia protonu wynosi 0.16-0.22 eV, podczas gdy rozerwanie wiązania pomiędzy grupą cukrową i fosforanową przebiega bez bariery energetycznej.

W tym kontekście należy zauważyć, że badania eksperymentalne tymidyny przeprowadzone w fazie gazowej wykazały zdolność niskoenergetycznych elektronów (<3 eV) do rozkładu tego związku do grupy cukrowej i zasady [36]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że przeniesienie elektronu z tyminy do grupy cukrowej oraz z grupy cukrowej do tyminy nie jest możliwe. Zaproponowany, że nadmiarowy ładunek jest lokalizowany bezpośrednio na jednej z tych grup prowadząc do rozerwania wiązania N-glikozydowego. Obserwacje te zostały później potwierdzone przez grupę z Innsbrucka, która wykonała eksperyment dla tymidyny w szerszym zakresie energii 0 - 12 eV [37]. Ponieważ, jak przyznają autorzy wspomnianych prac, wyniki pochodzą z częściowo rozłożonej próbki tymidyny należy je traktować z pewną dozą ostrożności.

Do badań procesów wychwytu elektronu przez fragment łańcucha DNA/RNA składający się z reszty fosforanowej i cukrowej, tj. rybozo-5’-fosforan (RP), wykorzystano w ostatnim czasie technikę LIAD (Laser-Induced Acoustic Desorption) [38]. Technika ta umożliwia przeniesienie do fazy gazowej biocząsteczek, które w innym przypadku ulegają termicznej degradacji [39]. Zgodnie z wynikami tych badań RP przyłącza elektrony o energii bliskiej 0 eV, co prowadzi do rozszczepienia wiązania pomiędzy resztą

fosforanową i cukrową. Proces wychwytu może prowadzić zarówno do pęknięcia wiązania C-O jak i P-O i utworzenia odpowiednio jonów H_2PO_4^- i $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_5^-$ [38]. W związku z tym sugerowano, że pęknięcia nici DNA spowodowane przyłączeniem niskoenergetycznych elektronów powstają w wyniku bezpośredniego przyłączenia elektronów do komponentów łańcucha DNA.

Pomimo licznych badań podjętych w celu określenia mechanizmu uszkodzeń DNA indukowanych elektronami dostępne wyniki nadal nie są spójne. W celu określenia mechanizmu uszkodzeń pojedynczoniciowych nukleotyd 2'-deoksycytydyny-5'-monofosforanu (dCMP) został zbadany w fazie gazowej metodą *beam*. Biorąc pod uwagę wcześniejsze wyniki otrzymane dla pojedynczych komponentów DNA, wyniki uzyskane dla dCMP dowodzą, że zarówno bezpośrednie przyłączenie elektronu do łańcucha jak i transfer nadmiarowego elektronu z cytozyny do łańcucha może przyczyniać się do powstania SSBs [H7].

Dysocjacyjny wychwyty elektronu przez 2'-deoksycytydino-5'-monofosforan prowadzi do powstawania jonów fragmentarycznych, które obserwowane są w dwóch obszarach energii, poniżej 2 eV oraz powyżej 5 eV. W tym ostatnim zakresie energii szereg wyraźnych rezonansów zaobserwowano przy m/z 16 i 1, które mogą być przypisane odpowiednio do O^-/NH_2^- i H^- (Rysunek 2 w pracy [H7]). W obszarze niskich energii zarejestrowano trzy kolejne fragmenty przy m/z 110, 95 i 45. Fragmentom o m/z 95, 110 zostały przypisane struktury PO_4^- i $(\text{C-H})^-$ (gdzie C = cytozyna), odpowiednio (Rysunek 1 w pracy [H7]), natomiast fragmentowi m/z 45 struktura HCOO^- (Rysunek 2 w pracy [H7]). Ponieważ jon HCOO^- obserwowany był jedynie w przypadku DEA przez takie związki jak ryboza, tetra-acetyloriboza i fruktoza [H2,H4,40], można zatem przyjąć, że jon ten powstaje w wyniku lokalizacji elektronu na reszcie cukrowej dCMP co prowadzi do późniejszej dekompozycji nukleotydu. Proces ten związany byłby z degradacją pierścienia jednostki cukrowej, a co za tym idzie z rozerwaniem wiązań pomiędzy grupą cukrową i fosforanową oraz pomiędzy grupą cukrową i zasadą azotową.

Utworzenie jonu PO_4^- związane jest z pęknięciem wiązania O-C łączącego resztę fosforanową i grupę cukrową, któremu towarzyszy utrata cząsteczki wodoru. Główny rezonans obserwowany jest przy energii progowej (≈ 0 eV), kolejny pik o znacznie niższej wydajności widoczny jest przy energii około 1 eV. Tak więc na krzywą wydajności jonu składają się dwa nakładające się rezonanse widoczne przy energii około 0 i 1 eV. Kolejny fragment m/z 110 został zidentyfikowany jako jon zamkniętopowłokowy $(\text{C-H})^-$, który powstaje w wyniku rozerwania wiązania N-glikozydowego. Wydajność jonu

obserwowanego poniżej 2 eV jest niewielka, ale wyraźnie powtarzalna w kolejnych eksperymentach.

Na podstawie profilu reakcji dysocjacyjnego wychwytu elektronów przez dCMP, uwzględniając poprzednie wyniki dla pojedynczych komponentów nukleotydu, można dojść do następujących wniosków dotyczących mechanizmu powstawania pojedynczonicowych pęknięć DNA:

- 1) Tworzenie jonu PO_4^- odzwierciedla powstawanie SSB. Główny rezonans obserwowany przy ≈ 0 eV najprawdopodobniej powstaje w wyniku bezpośredniej lokalizacji elektronu na reszcie fosforanowej.
- 2) Rezonans o niskiej wydajności przy ≈ 1 eV w przypadku jonu PO_4^- wskazuje na to, że elektron początkowo lokalizowany jest na zasadzie azotowej a następnie migruje do łańcucha DNA powodując pęknięcie wiązania pomiędzy resztą fosforanową i grupą cukrową.
- 3) Tworzenie jonu HCOO^- wskazuje na to, że elektron może być również przyłączony do grupy cukrowej prowadząc do uszkodzenia centralnej części nukleotydu.

Wyniki uzyskane dla dCMP pozwoliły stwierdzić udział dwóch mechanizmów w powstawaniu pęknięć pojedynczonicowych, mianowicie mechanizmu polegającego na bezpośrednim przyłączeniu elektronu do łańcucha DNA jak i mechanizmu opartego na transferze elektronu z zasady do łańcucha. Należy jednak podkreślić, że mechanizm polegający na bezpośrednim przyłączeniu elektronu do łańcucha DNA jest mechanizmem dominującym. W tym miejscu należy wspomnieć, że w przypadku eksperymentu dla samoorganizujących się warstw oligonukleotydów zaobserwowano, że guanina szczególnie efektywnie wychwytuje niskoenergetyczne elektrony [41]. Tak więc nie można wykluczyć, że w przypadku zmiany zasady azotowej odpowiednie udziały powyższych mechanizmów ulegną zmianie.

Przedstawione w tym rozdziale wyniki stanowią pierwsze doniesienia świadczące o tym, że zarówno przyłączenie elektronu do zasady azotowej z późniejszym przeniesieniem do łańcucha jak i bezpośredni wychwyty elektronu przez grupę cukrową i fosforanową mogą prowadzić do uszkodzeń DNA.

2 Dysocjacyjny wychwyty elektronów przez aminokwasy

W rzeczywistych układach DNA komórkowe otoczone jest cząsteczkami sąsiadującymi takimi jak woda czy aminokwasy. Obecność tych cząsteczek ma zasadniczy wpływ na powstawanie uszkodzeń w wyniku działania promieniowania jonizującego.

Cząsteczki te ulegają radiolizie a powstające reaktywne produkty pośrednie mogą wywoływać uszkodzenia DNA (uszkodzenia pośrednie). Uważa się, że uszkodzenia wywołane działaniem promieniowania (zakładając małą gęstość jonizacji) tylko w jednej trzeciej wynikają z bezpośredniego uszkodzenia nici, podczas gdy dwie trzecie uszkodzeń powstaje w sposób pośredni [42], ze znaczącym udziałem rodników OH powstających w wyniku radiolizy wody.

Badania aminokwasów, podstawowych jednostek budulcowych peptydów, i ich agregatów są niezwykle istotne. Agregaty zbudowane są z reszt aminokwasowych połączonych wiązaniami peptydowymi i tym samym mogą być traktowane jako układy modelowe do badania oddziaływania elektronów z białkami. Niektóre białka (np. białka histonowe) interkalowane są wewnątrz rowków DNA dzięki czemu mogą bezpośrednio oddziaływać z zasadami. Fragmentacja aminokwasów może prowadzić do utworzenia wtórnych reaktywnych rodników, które w dalszej kolejności mogą reagować z komponentami kwasów nukleinowych i ostatecznie prowadzić do uszkodzeń DNA. Stąd też badania te są niezwykle istotne, w szczególności z radiobiologicznego punktu widzenia. Zrozumienie działania promieniowania, ale przede wszystkim wpływu niskoenergetycznych elektronów na uszkodzenia genomu, wymaga zatem informacji na temat uszkodzeń aminokwasów.

2.1 Aminokwasy w formie kanonicznej

In vivo aminokwasy występują w formie jonu obojnaczego. Przeniesione do fazy gazowej tracą własności jonu obojnaczego i występują przede wszystkim w postaci kanonicznej [43,44]. W literaturze można znaleźć liczne doniesienia naukowe na temat oddziaływania aminokwasów w formie kanonicznej z niskoenergetycznymi elektronami. Stwierdzono między innymi, że wśród licznych jonów fragmentarycznych najbardziej wydajnym jest ten, który powstaje w wyniku oderwania obojętnego atomu wodoru $(M-H)^-$ (gdzie M = aminokwas) [45,46,47]. Maksimum piku dla głównego rezonansu znajduje się między 1.2-1.3 eV. Oderwanie obojętnego atomu H może następować w różnym miejscu, np. z grupy aminowej, grupy metylowej lub metylenowej albo z grupy karboksylowej. Badania przeprowadzone dla kwasu mrówkowego i jego deuterowanych analogów wskazują, że następuje ona w grupie karboksylowej [48]. Obserwacje te zostały ostatnio potwierdzone obliczeniami teoretycznymi wykonanymi dla aminokwasów alifatycznych, tj. walina [49] i (izo)leucyna [50]. Krzywa wydajności jonu $(M-H)^-$ w przypadku prostych aminokwasów (np. glicyny, alaniny, waliny i (izo)leucyny) ma charakterystyczny stromy

początek, podczas gdy prawe ramię krzywej wykazuje wyraźne struktury [51]. Istnienie pików podstawowego i następujących po nim struktur guzkowatych można wyjaśnić konkurencją pomiędzy dysocjacyjnym wychwytem elektronów i wzbudzeniem drgań wiązania OH w cząsteczce obojętnej [51]. Obliczenia wykonane metodą macierzową (R-matrix) [52,53] sugerują, że wychwyt elektronów następuje na orbital $\sigma^*(\text{O-H})$ z następującą dekompozycją TNI wzdłuż odpychającej krzywej potencjału. Obliczenia te opisują utratę atomu H dla szeregu kwasów organicznych. Z drugiej jednak strony nie można całkowicie wykluczyć proponowanego przez Vasil'eva i współpracowników dla glicyny i jej estrów oscylacyjnego rezonansu Feshbacha powstającego za pośrednictwem stanu związanego dipolowo [54].

W celu przeanalizowania (ewentualnych) zmian zachowania bardziej złożonych układów w stosunku do prostych aminokwasów (tj. glicyna, alanina) wykonano badania dysocjacyjnego wychwytu elektronu przez *N*-metyloglicynę, *N*-metyloalaninę [**H8**], *N*-acetyloglicynę [**H9**] i L-alanylo-glicynę [**H10**].

Okazuje się, że główny kanał reakcji DEA (tworzenie zamkniętopowłokowego jonu $(\text{M-H})^-$) obserwowany jest również w przypadku badanych związków. Podczas gdy, dla *N*-metyloglicyny i *N*-metyloalaniny maksimum pików pojawia się w tym samym przedziale energii (Rysunek 2 w pracy [**H8**]) jak dla glicyny i alaniny, dla *N*-acetyloglicyny (Rysunek 2 w pracy [**H9**]) i alanylo-glicyny (Rysunek 2 w pracy [**H10**]) obserwujemy przesunięcie batochromowe maksimum rezonansu $(\text{M-H})^-$ do energii 1.1 eV. Podobne zmiany obserwowano dla dipeptydów dialaniny [55], glicylo-glicyny, glicylo-alaniny i alanylo-alaniny [56]. To, że położenie rezonansów zmienia się wraz z wielkością cząsteczki, najprawdopodobniej związane jest ze wzrostem powinowactwa elektronowego rodnika (M-H) tak aby reakcja DEA była z termodynamicznego punktu widzenia możliwa. Należy tutaj dodać, że dla cząsteczek zawierających wiązanie peptydowe (*N*-acetyloglicyny i alanylo-glicyny) obserwujemy dodatkowy rezonans w obrębie krzywej wydajności jonu $(\text{M-H})^-$. Struktura ta pojawia się po stronie niższych energii (przy około 0.8 eV) względem głównego pików. Według ostatnich obliczeń wykonanych dla alanylo-alaniny oderwanie atomu H z grupy amidowej może również wносить wkład do wydajności jonu $(\text{M-H})^-$ poniżej 1 eV [55]. Możemy zatem przyjąć, że powstanie jonu $(\text{M-H})^-$ przy 0.8 i 1.1 eV jest spowodowane rozerwaniem odpowiednio wiązania N-H lub O-H.

Kolejne obserwowane jony fragmentaryczne powstają albo w wyniku pęknięcia pojedynczego wiązania albo wymagają rozerwania wielu wiązań i przegrupowania w TNI. W dalszej części, niektóre z tych fragmentów zostaną omówione w sposób szczegółowy.

Cechą wspólną dla wszystkich badanych aminokwasów jest tworzenie jonów w wyniku rozerwanie wiązania N-C α . W każdym przypadku piki rezonansowe pojawiają się w obszarze energii 1.7-2 eV, a więc jak wynika z badań elektronowej spektroskopii transmisyjnej przy energii charakterystycznej dla normalnie nieobsadzonego orbitala π^* grupy karboksylowej [57]. W związku z tym zaproponowano, że jony te powstają w wyniku lokalizacji nadmiarowego ładunku na grupie karboksylowej, prowadzącego do utworzenia jonów C-terminalnych. Zostało to również potwierdzone przez Sobczyk i współpracowników [58] w obliczeniach pionowych energii wychwyty (vertical attachment energies, VAEs) dla orbitali π^* i σ^* . Jak zostało pokazane, elektrony o energii około 2.5 eV mogą w sposób pośredni przyczyniać się do rozerwania wiązania N-C α . W pierwszym etapie elektron zlokalizowany jest na orbitalu π^* grupy karboksylowej, w kolejnym etapie następuje wydłużenie wiązania N-C α i ostatecznie jego pęknięcie. W przypadku *N*-metyloglicyny i *N*-metyloalaniny (Rysunek 3 w pracy [H8]) obserwowaliśmy tworzenie jonów wyłącznie w wyniku pęknięcia wiązania N-C α , podczas gdy dla *N*-acetyloglicyny (Rysunek 3 w pracy [H9]) i alanylo-glicyny (Rysunek 3 w pracy [H10]) temu procesowi towarzyszyło przeniesienie atomu H, w wyniku czego powstawały obojętne cząsteczki odpowiednio CH₃C(O)NH₂ i NH₂CH(CH₃)C(O)NH₂. W przypadku alanylo-glicyny obserwowaliśmy również tworzenie jonu komplementarnego (NH₂CH(CH₃)C(O)NH)⁻ najprawdopodobniej w wyniku lokalizacji elektronu na grupie amidowej.

Jonem fragmentarycznym, który obserwowany jest wyłącznie w przypadku *N*-acetyloglicyny i alanylo-glicyny jest jon powstający w wyniku utraty obojętnej cząsteczki wody. Utworzenie jonu (M-H₂O)⁻ wymaga rozerwania wielu wiązań stąd też w przypadku *N*-acetyloglicyny obserwowany jest jako słaby rezonans przy energii nieco poniżej 2 eV (Rysunek 3 w pracy [H9]). Natomiast w przypadku alanylo-glicyny jon ten jest jednym z najbardziej intensywnych rezonansów widocznym przy energii około 2 eV z dodatkowym słabym rezonansem przy energii około 0 oraz 6 eV (Rysunek 5 w pracy [H10]).

Dla dipeptydu alanylo-glicyny obserwujemy również bezpośrednie rozerwanie wiązania peptydowego C-N w wyniku czego powstaje jon NH₂CH(CH₃)CO⁻ (C₃H₆NO⁻, m/z 72). Jon ten widoczny jest poprzez trzy rezonanse przy energii \approx 0, 1.2 i 5.3 eV (Rysunek 3 w pracy [H10]). Ostatnie wyniki dla glicylo-alaniny i alanylo-alaniny [56] sugerują jednak, że przy m/z 72 obserwowane są dwa jony izobaryczne, mianowicie

$C_3H_6NO^-$ i $C_3H_4O_2^-$. W eksperymentach tych jon $C_3H_6NO^-$, w przypadku obu dipeptydów, obserwowany był w zakresie energii 1-2 eV i 5-6 eV, co zgodne jest z naszymi obserwacjami eksperymentalnymi. Natomiast jon $C_3H_4O_2^-$ obserwowano głównie w zakresie energii 1-2 eV. Na podstawie naszych wyników eksperymentalnych nie można wykluczyć tworzenia jonu $C_3H_4O_2^-$, jednakże proces ten wymaga przegrupowania w obrębie TNI (tj. migracji grupy metylowej) dlatego też jego tworzenie jest mniej prawdopodobne.

Badania procesu wychwytu niskoenergetycznych elektronów (0-12 eV) przeprowadzone zostały również dla metioniny. Fragmentacja aminokwasu zawierającego siarkę jest bardzo bogata i przebiega w całym badanym zakresie energii [H11]. Tak jak poprzednio, dominującym jonem jest jon powstający w wyniku oderwania obojętnego atomu H z cząsteczki macierzystej ($M-H^-$) (Rysunek 2 w pracy [H11]), który powstaje w wyniku rozerwania wiązania O-H w grupie karboksylowej. Kolejny jon ($CH(NH_2)COOH^-$) powstaje w wyniku pęknięcia wiązania $C_\alpha-C_\beta$ z jednoczesną lokalizacją nadmiarowego elektronu na grupie karboksylowej. Krzywa wydajności jonu charakteryzuje się dwiema dominującymi strukturami przy energii około 5 i 7 eV (Rysunek 2 w pracy [H11]). Rezonanse te obserwowane są powyżej progu termodynamicznego (≈ 3.2 eV) oszacowanego dla tworzenia jonu w wyniku bezpośredniego rozerwania wiązania C-C. Na tej podstawie możemy stwierdzić, że intensywność jonu ($CH(NH_2)COOH^-$) powyżej 4 eV rzeczywiście związana jest z pęknięciem pojedynczego wiązania C-C, a struktury przypisane są rdzeniowo wzbudzonym rezonansom. Pík rezonansowy o niskiej wydajności obserwowany poniżej 2 eV musi natomiast powstawać w wyniku bardziej złożonych procesów, np. rozerwanie wiązania C-C z jednoczesną migracją wodoru, w wyniku czego powstaje jon $CH_2(NH_2)COO^-$. Powinowactwo elektronowe fragmentu $CH_2(NH_2)COO$ jest wysokie (3.66 eV [45]) stąd też proces możliwy jest poniżej 1 eV. Alternatywnym procesem dla lokalizacji nadmiarowego elektronu jest tworzenie zamkniętopowłokowego jonu tiometylowego CH_3S^- (Rysunek 2 w pracy [H11]) obserwowanego przy energii 2.5, 5 oraz 8 eV. Jon powstaje w wyniku pęknięcia pojedynczego wiązania $C_\gamma-S$, co zgodnie z danymi termodynamicznymi (energia dysocjacji wiązania C-S wynosi około 2.4 eV [59], natomiast powinowactwo elektronowe CH_3S wynosi 1.87 eV [60]) możliwe jest już przy energii około 0.5 eV.

Ponadto, DEA przez metioninę prowadzi do utworzenia dwóch par jonów komplementarnych (Rysunek 3 w pracy [H11]). Pierwszą parę obserwowano przy m/z 132 i 17 i przypisano im odpowiednie struktury $(M-OH)^-$ i OH^- . Należy tutaj wspomnieć, że jon m/z 132 może w zasadzie zostać utworzony w wyniku utraty cząsteczki NH_3 . Z obliczeń kwantowo-mechanicznych przeprowadzonych dla waliny wynika jednak, że przy energii 1-2 eV możliwe jest jedynie utworzenie jonu $(M-OH)^-$. Kolejna para jonów komplementarnych zarejestrowana została przy m/z 133 i 16. W tym przypadku sytuacja jest bardziej skomplikowana, tak więc fragmentowi rejestrowanemu przy m/z 133 może zostać przypisana albo struktura $(M-O)^-$ albo $(M-NH_2)^-$, natomiast fragmentowi o m/z 16 albo O^- albo NH_2^- . Jon $(M-NH_2)^-$ może powstać w wyniku pęknięcia wiązania $N-C_\alpha$ co rzeczywiście obserwowano w przypadku *N*-metyloglicyny i *N*-metyloalaniny [H8] oraz waliny [61]. Podczas gdy dla *N*-metylo pochodnych aminokwasów oraz waliny reakcja ta była jednym z bardziej intensywnych procesów, w przypadku metioniny jest to proces charakteryzujący się bardzo niską wydajnością. Bardzo efektywnym kanałem reakcji w przypadku metioniny jest natomiast tworzenie jonu $(C_4NOH_5)^-$ (Rysunek 4 w pracy [H11]). Jon ten widoczny jest już przy energii zbliżonej do 0 eV, dlatego reakcji najprawdopodobniej towarzyszy utworzenie stabilnych obojętnych cząsteczek, np. wody i CH_3SH .

2.2 Aminokwasy w formie jonu obojnego

Jak wspomniano wcześniej, w przeciwieństwie do formy kanonicznej występującej w fazie gazowej, aminokwasy zarówno w roztworach wodnych i w fazie skondensowanej występują w postaci jonów obojnych $NH_3^+-CHR-COO^-$ [62]. Aby zbadać zachowanie aminokwasów występujących w formie zwitterjonowej w procesach oddziaływania z niskoenergetycznymi elektronami wybraliśmy *N,N,N*-trimetyloglicynę (glicyna-betaina, $(CH_3)_3N^+CH_2COO^-$) [H12]. Glicyna-betaina jest biologicznie ważną cząsteczką syntetyzowaną w tkankach zwierzęcych. Sądzymy, że może ona służyć jako układ modelowy do badania procesów chemicznych indukowanych przez LEEs.

Okazuje się, że fragmentacja glicyny-betainy przebiega w ograniczonym zakresie energii poniżej 2 eV (Rysunek 2 w pracy [H12]). Jest to zachowanie odmienne w porównaniu do obserwowanego eksperymentalnie jak i przewidywanego teoretycznie dla aminokwasów występujących w formie kanonicznej [45,63]. Jednak obliczenia Baccarelli i współpracowników [64] wykonane dla glicyny występującej w formie jonu

obojnaczego rzeczywiście wskazują na obecność kilku przejściowych jonów ujemnych (TNI) w obszarze niskich energii.

Jak wykazano w poprzednim paragrafie, w przypadku aminokwasów w formie kanonicznej najbardziej intensywnym kanałem reakcji jest tworzenie jonu $(M-H)^-$ w wyniku oderwania atomu H z grupy karboksylowej. Dla glicyny-betainy reakcja ta nie powinna przebiegać, ponieważ brak jest atomu H w grupie karboksylowej. Mimo braku tego atomu obserwujemy tworzenie jonu $(M-H)^-$ już przy energii progowej (Rysunek 2 w pracy [H12]). Warto tutaj wspomnieć, że Baccarelli i współpracownicy [64] przewidzieli tworzenie jonu $(M-H)^-$ dla glicyny w formie zwitterjonowej już przy energii progowej, zatem znacznie poniżej energii rezonansów obserwowanych dla aminokwasów w formie kanonicznej. W przypadku glicyny-betainy utrata atomu H może przebiegać albo z pozycji C_α albo z jednej z trzech grup metylowych. W obszarze niskich energii TNI powstaje zwykle zgodnie z mechanizmem określonym jako rezonans kształtu, w przypadku którego nadmiarowy elektron lokalizowany jest na najniższym wolnym orbitalu molekularnym. Poza klasycznymi stanami związanymi walencyjnie, w przypadku cząsteczek o dostatecznie wysokiej wartości momentu dipolowego mogą powstawać aniony związane dipolowo (DB). Ogólnie rzecz biorąc, stany DB są stanami niedysocjacyjnymi. W pewnych sytuacjach, mogą jednak sprzęgać się ze stanami walencyjnymi. Dochodzi wówczas do dysocjacji TNI [17] (*vide supra*). W przypadku glicyny-betainy obliczony moment dipolowy wynosi 11.5 D [65]. Jest zatem wystarczająco wysoki aby stan DB pośredniczył w procesie dysocjacji cząsteczki.

Obserwowano także jony fragmentaryczne przy m/z 102, 86, 77, 75 i 58 (Rysunek 2 w pracy [H12]), które prawdopodobnie powstają w wyniku rekombinacji nadmiarowego elektronu i dodatnio naładowanej grupy aminowej ($(CH_3)_3N^+-R$; $R = CH_2COO^-$). Fragmentom rejestrowanym przy m/z 102 i 58 mogą być jednoznacznie przypisane struktury $(CH_3)_2NCH_2COO^-$ i CH_2COO^- . Powstają one w wyniku utraty grupy metylowej lub obojętnej cząsteczki trimetyloaminy. Jony rejestrowane przy m/z 86, 77 i 75 tworzą się w wyniku bardziej złożonych reakcji i wymagają przegrupowania w obrębie TNI. Jonom tym zostały przypisane struktury $CH_3NCHCOO^-$, $H_2NCH_2CH(OH)_2^-$ i $(H_3N^+CH_2COO^-)^- / H_2NCH_2COOH^-$. Ich powstanie prawdopodobnie związane jest z utworzeniem obojętnych odpowiedników C_2H_6+H , C_3H_4 i C_3H_6 (Tabela 1 w pracy [H12]). Szczególnie interesującym jest jon m/z 75, któremu, jak pokazano powyżej, przypisano strukturę jonu molekularnego glicyny. Na podstawie wyników eksperymentalnych nie jesteśmy jednak

w stanie określić czy jon ten występuje w postaci kanonicznej czy też zachowuje strukturę zwitterjonową.

3 Oddziaływanie elektronów z cisplatyną

Cis-diaminadichloroplatyna(II), potocznie nazywana cisplatyną, jest związkiem koordynacyjnym ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$) należącym do grupy leków alkilujących stosowanych w chemioterapii. Jej toksyczność związana jest ze zdolnością tworzenia mostków między dwoma łańcuchami DNA lub wiązań w obrębie pojedynczej nici, w wyniku czego zostaje zahamowana replikacja. Dominującym kompleksem jest jednak ten, który powstaje w wyniku przyłączenia cisplatyny przy dwóch sąsiadujących cząsteczkach guaniny [66]. W ostatnim czasie wykazano, że połączenie leku z radioterapią zwiększa przeżywalność pacjentów z chorobą nowotworową w porównaniu do tych, którzy poddawani byli wyłącznie radioterapii [67]. Największy efekt osiągnęto w przypadku jednoczesnego stosowania chemio- i radioterapii. Efekt ten został przypisany niezidentyfikowanemu synergistycznemu oddziaływaniu między lekiem i promieniowaniem, którego mechanizm nie został dotychczas wyjaśniony. W czasie napromieniowania, wtórne elektrony produkowane są z dużą wydajnością i z tego względu zasugerowano, że mogą one skutecznie uczestniczyć w procesie aktywacji leku w chemioradioterapii. Eksperymenty przeprowadzone przez Sanche i współpracowników dla czystych próbek DNA oraz związanych z cisplatyną, które bombardowane były wiązką elektronów o zmiennej ale zdefiniowanej energii, wykazały iż liczba pęknięć nici wzrasta w obecności cisplatyny [68]. Na tej podstawie zasugerowano, że tworzenie TNIs w wyniku przyłączenia elektronów będzie odgrywało kluczową rolę w efekcie wzmocnienia działania leku w połączeniu z radioterapią.

Aby zdefiniować rolę, jaką odgrywają niskoenergetyczne elektrony w procesie aktywacji cisplatyny w chemioradioterapii, wykonaliśmy badania oddziaływania elektronów z tym związkiem w fazie gazowej [H13]. W ramach eksperymentu stwierdziliśmy istnienie TNIs w obszarze bardzo niskich energii, które rozpadają się w wyniku utraty obojętnego atomu Cl lub w wyniku utworzenia jonu Cl^- , prowadząc tym samym do powstawania komplementarnych jonów fragmentarycznych (Rysunek 2 w pracy [H13]). Oba fragmenty powstają w wyniku pęknięcia pojedynczego wiązania P-Cl. Na szczególną uwagę zasługuje jednak fakt, że proces wychwytu niskoenergetycznego elektronu powoduje utratę jednocześnie obu atomów Cl, co prowadzi do powstania dwóch kolejnych komplementarnych jonów, mianowicie $(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2)^+$ i Cl_2^- (Rysunek 3 w pracy

[H13]). Nasze obserwacje znalazły potwierdzenie w pracy teoretycznej opublikowanej przez grupę Gianturco [69]. Sugerujemy, że jon $(Pt(NH_3)_2)^-$ może być traktowany jako reaktywny produkt pośredni w procesie tworzenia adduktów cisplatyna-DNA. Chociaż fakt, że przyłączenie pojedynczego elektronu do cisplatyny może powodować utratę dwóch atomów Cl jest niezwykle istotny sam w sobie, wyniki naszego eksperymentu pokazują, że wychwytywanie elektronu bądź jego transfer może być uważany za bezpośrednią drogę prowadzącą do powstania adduktów cisplatyna-DNA.

Podsumowanie

Przedstawione w pracy wyniki świadczą o tym, że związki o biologicznym znaczeniu, takie jak komponenty DNA/RNA a także aminokwasy i dipeptydy charakteryzują się niskoenergetycznymi rezonansami. W niektórych przypadkach (tj. cząsteczki cukru, reszta fosforanowa) rezonanse obserwowane są już przy energiach progowych (≈ 0 eV). Jest to zjawisko zaskakujące, bowiem niskoenergetyczne rezonanse obserwowane były dotychczas wyłącznie w przypadku dysocjacyjnego wychwytywania elektronów przez halogenopochodne węglowodory organiczne i związane były z utworzeniem jonów halogenowych. W przypadku związków organicznych, takich jak liniowe lub cykliczne węglowodory lub alkohole (np. metanol) obserwowane rezonanse występują przy wyższych energiach, tj. blisko poziomu wzbudzenia elektronowego cząsteczki lub powyżej [70,71].

To iż komponenty DNA oraz aminokwasy wykazują niskoenergetyczne rezonanse w procesie DEA, ma bardzo ważne znaczenie dla ogólnego opisu uszkodzeń wywoływanych przez promieniowanie jonizujące. Jak już zostało wspomniane we wstępie (i) wtórne elektrony o energii do kilkudziesięciu eV powstają z bardzo wysoką wydajnością w procesie oddziaływania wysokoenergetycznych kwantów promieniowania (np. fotony o energii w zakresie MeV) z materiałem biologicznym oraz (ii) bombardowanie plazmidowego DNA wiązką niskoenergetycznych elektronów powoduje pęknięcia nici DNA.

Mechanizm odpowiedzialny za uszkodzenia nici DNA nie był dotychczas poznany. Sugerowano, że pierwszym etapem może być proces przyłączenia elektronu prowadzący do utworzenia TNI. Na podstawie wyników uzyskanych w ramach niniejszej pracy zaproponowałam schemat uszkodzeń DNA przez niskoenergetyczne elektrony.

Wyniki eksperymentalne procesu wychwytywania elektronów przez sześć- i pięciocząłkowe cząsteczki cukrów świadczą o wysokiej wrażliwości tych związków

względem niskoenergetycznych elektronów już w zakresie energii bliskich 0 eV. Wychwytywanie elektronów jest procesem bardzo złożonym i prowadzi do utraty jednej lub kilku obojętnych cząsteczek H₂O i H₂CO. Badania z użyciem izotopowo znaczonej cząsteczki rybozy wskazały na niezwykle selektywność tego procesu, który przebiega poprzez utratę jednostek zawierających atom węgla C5, podczas gdy nadmiarowy ładunek lokalizowany jest w pozycji C1.

Do określenia zachowania reszt cukrowych w DNA wykorzystaliśmy jako związek modelowy tetra-acetyloribozę (TAR). Podobnie jak grupa cukrowa w DNA związek ten charakteryzuje się strukturą pięciocząłową. Uważam ponadto iż polarne grupy acetylowe mogą ze względu na podobną wartość powinowactwa elektronowego w właściwy sposób odzwierciedlać zachowanie reszt fosforanowych i zasad azotowych. Reakcje DEA w przypadku TAR można jednoznacznie przypisać rezonansom (TNI) charakterystycznym dla poszczególnych fragmentów cząsteczki. TNI powstający przy energii bliskiej 0 eV rozpada się prowadząc do utworzenia licznych jonów fragmentarycznych, które powstają w wyniku destrukcji pierścienia. Proces ten może być utożsamiany z pęknięciem nici DNA.

Pochodne kwasu fosforowego takie jak estry dibutyłowe (DBP) oraz trietyłowe (TEP) mogą być traktowane jako analogi odzwierciedlające zachowanie grupy fosforanowej w DNA. Oba estry wychwytyują elektrony w szerokim zakresie energii od około 0 do 10 eV. Najistotniejszą reakcją w kontekście uszkodzeń DNA jest pęknięcie wiązania C-O lub P-O oraz utrata jednostek zawierających atom fosforu. Reakcje te mogą być utożsamiane z bezpośrednim rozerwaniem łańcucha DNA.

Wyniki eksperymentalne, które uzyskałam dla analogów grupy fosforanowej i cząsteczek cukrów wskazują na to, że *bezpośrednie* przyłączenie elektronów do komponentów łańcucha DNA może prowadzić do pęknięcia nici. Inny, *pośredni* mechanizm uszkodzeń został przewidziany w obliczeniach teoretycznych. W mechanizmie tym niskoenergetyczny elektron przyłączany jest do zasady azotowej, która określana jest mianem 'anteny'. W następnym etapie elektron migruje do grupy fosforanowej powodując pęknięcie nici DNA.

Przeprowadziłam również pionierski eksperyment dla nukleotydu 2'-deokycydyno-5'-monofosforanu (dCMP) w fazie gazowej. Na podstawie uzyskanych wyników określiłam względne udziały proponowanych mechanizmów w uszkodzeniach DNA (*bezpośrednie* przyłączenie elektronu do łańcucha DNA lub wychwytywanie elektronu przez zasadę azotową i jego *migracja* do grupy fosforanowej). Interpretacja wyników

otrzymanych dla dCMP opiera się na tym, że w przypadku procesów dysocjacyjnego wychwytu elektronów profil krzywej wydajności jonów niesie informacje dotyczące pierwotnego procesu lokalizacji elektronów.

Wychwyt elektronu przez dCMP prowadzi między innymi do utworzenia jonów PO_4^- i HCOO^- , które obserwowane są przy energii bliskiej 0 eV. Wynik ten wskazuje, że wychwyt następuje bezpośrednio, odpowiednio, na grupie fosforanowej lub cukrowej. Krzywa wydajności jonu PO_4^- charakteryzuje się dodatkowym rezonansem przy energii 1 eV, który najprawdopodobniej powstaje w wyniku przyłączenia elektronu do zasady z następującą migracją tegoż elektronu do łańcucha. Proces ten prowadzi do powstania jonu PO_4^- i do pojedynczonicowego pęknięcia. Wyniki te sugerują, że większość SSB powstaje w wyniku *bezpośredniego* przyłączenia elektronów do łańcucha, podczas gdy tylko około 15% związanych jest z *migracją* elektronu z zasady azotowej do reszty fosforanowej.

Powyższe wyniki dotyczą *bezpośredniego* mechanizmu uszkodzeń DNA (co oznacza reakcje niskoenergetycznych elektronów z DNA), nie należy jednak zapominać o wpływie cząsteczek pozostających w sąsiedztwie DNA na proces uszkodzeń radiacyjnych. Otaczające cząsteczki mogą zarówno chronić DNA, jak też poprzez wytworzenie reaktywnych produktów pośrednich powodować uszkodzenia DNA (uszkodzenia pośrednie). Zgodnie z moimi obserwacjami, aminokwasy wykazują niskoenergetyczne rezonanse w zakresie energii 1.2-1.5 eV. Dominujący kanał reakcji związany jest z utratą obojętnego atomu H z grupy karboksylowej. Oznacza to, że otaczające cząsteczki białka mogą być znacznie bardziej wrażliwe na atak niskoenergetycznych elektronów niż otaczające cząsteczki wody. Woda bowiem charakteryzuje się rezonansami wyłącznie powyżej 6 eV (rezonanse Feshbacha) prowadząc do utworzenia OH i OH^- [72,73].

Wychwyt elektronów przez cisplatynę, lek przeciwnowotworowy, prowadzi do utworzenia rezonansów (TNI) przy energii bliskiej 0 eV, powiązanych z oderwaniem dwóch atomów Cl. Świadczy to o tym, że cisplatyna może być aktywowana przez niskoenergetyczne elektrony na etapie tworzenia adduktów cisplatyna-DNA powodujących zahamowanie replikacji. Zatem chemioradioterapia polegająca na jednoczesnym stosowaniu cisplatyny i radioterapii znajduje naukowe uzasadnienie i wydaje się być obiecującą metodą w terapii nowotworowej.

Oprócz ogólnego problemu dotyczącego uszkodzeń radiacyjnych i radioterapii prezentowane wyniki dotyczą bardziej fundamentalnych problemów, mianowicie w jaki

sposób zmienia się zachowanie i własności układów przy przejściu od pojedynczych cząsteczek do bardziej złożonych agregatów.

Literatura

Prace własne stanowiące podstawę rozprawy habilitacyjnej:

- [H1] I. Baccarelli, I. Bald, F.A. Gianturco, E. Illenberger, J. Kopyra, *Physics Reports*, 508 (2011) 1.
- [H2] I. Bald, J. Kopyra, and E. Illenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 4851.
- [H3] I. Baccarelli, F.A. Gianturco, A. Grandi, N. Sanna, R.R. Lucchese, I. Bald, J. Kopyra, and E. Illenberger, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 6269.
- [H4] I. Bald, J. Kopyra, I. Dabkowska, E. Antonsson, and E. Illenberger, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 074308.
- [H5] C. König, J. Kopyra, I. Bald, and E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 018105.
- [H6] J. Kopyra, C. König, E. Illenberger, *Int. J. Mass Spectrom.* 281 (2009) 89.
- [H7] J. Kopyra, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 8289.
- [H8] J. Kopyra, *Chem. Phys. Lett.* 533 (2012) 87.
- [H9] J. Kopyra, C. König-Lehmann, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.* 550 (2012) 47.
- [H10] J. Kopyra, C. König-Lehmann, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.* 578 (2013) 54.
- [H11] J. Kopyra, I. Szamrej, H. Abdoul-Carime, B. Farizon, M. Farizon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 8000.
- [H12] J. Kopyra, H. Abdoul-Carime, *J. Chem. Phys.* 132 (2010) 204302.
- [H13] J. Kopyra, C. König-Lehmann, I. Bald, E. Illenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 7904.

Dalsze pozycje literaturowe:

-
- [1] T. Jahnke, H. Sann, T. Havermeier, K. Kreidi, C. Stuck, M. Meckel, M. Schoffler, N. Neumann, R. Wallauer, S. Voss, A. Czesch, O. Jagutzki, A. Malakzadeh, F. Afaneh, Th. Weber, H. Schmidt-Bocking, R. Dorner, *Nature Phys.* 6 (2010) 139.
 - [2] B. Boudaiffa P. Cloutier, D. Hunting, M.A. Huels, and L. Sanche, *Science* 287 (2000) 1658.
 - [3] F. Martin, P. D. Burrow, Z. Cai, P. Cloutier, D. Hunting, and L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.* 93 (2004) 068101

-
- [4] C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London 1987.
- [5] C. von Sonntag, *Free-Radical-Induced-DNA Damage and its Repair. A Chemical Perspective*, Springer Verlag, Berlin 2006.
- [6] S. Ptasinska, S. Denifl, P. Scheier, and T.D. Maerk, *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 8505.
- [7] I. Bald, H.D. Flosadottir, J. Kopyra, E. Illenberger, O. Ingolfsson, *Int. J. Mass Spectrom.* 280 (2009) 190.
- [8] P. Sulzer, S. Ptasinska, F. Zappa, B. Mielewska, A.R. Milosavljevic, P. Scheier, and T.D. Maerk, *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 044304.
- [9] H.D. Flosadottir, I. Bald, O. Ingolfsson, *Int. J. Mass Spectrom.* 305 (2011) 50.
- [10] L.-P. Guler, Y.-Q. Yu, H.I. Kenttamäa, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 6754.
- [11] E.J. Cocinero, A. Lesarri, P. Ecija, F.J. Basterretxea, J.-U. Grabow, J.A. Fernandez, and F. Castano, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 1.
- [12] I. Bald, H.D. Flosadóttir, J. Kopyra, E. Illenberger, O. Ingólfsson, *Int. J. Mass Spectrom.* 280 (2009) 190.
- [13] B.C. Ibanescu, O. May, A. Monney and M. Allan, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 3163.
- [14] J. Kalcher, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.* 93 (1997) 147.
- [15] C. Desfrancois, H. Abdoul-Carime, and J.P. Schermann, *J. Chem. Phys.* 104 (1996) 7792.
- [16] P. Wlodarczyk, K. Kaminski, S. Haracz, M. Dulski, M. Paluch, J. Ziolo, and M. Wygledowska-Kania, *J. Chem. Phys.* 132 (2010) 195104.
- [17] T. Sommerfeld, *J. Phys.: Conf. Ser.* 4 (2005) 245.
- [18] T. Sommerfeld, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 124301.
- [19] K. Aflatooni, A.M. Scheer, and P.D. Burrow, *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 054301.
- [20] R. Barrios, P. Skurski, J. Simons, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 7991.
- [21] J. Simons, *Acc. Chem. Res.* 39 (2006) 772.
- [22] S. Gohlke, H. Abdoul-Carime, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.* 380 (2003) 595.
- [23] R. Abouaf, J. Pommier, H. Dunet, *Int. J. Mass Spectrom.* 226 (2003) 397.
- [24] H. Abdoul-Carime, J. Langer, M.A. Huels, E. Illenberger, *Eur. Phys. J. D* 35 (2005) 399.
- [25] M. Imhoff, Z. Deng, M.A. Huels, *Int. J. Mass Spectrom.* 245 (2005) 68.

-
- [26] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, and E. Illenberger, *Phys. Rev. Lett.* 92 (2004) 168103.
- [27] S. Ptasińska, S. Denifl, B. Mróz, M. Probst, V. Grill, E. Illenberger, P. Scheier, T.D. Maerk, *J. Chem. Phys.* 123 (2005) 124302.
- [28] S. Ptasińska, S. Denifl, P. Scheier, E. Illenberger, T.D. Maerk, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 6941.
- [29] S. Denifl, S. Ptasińska, M. Probst, J. Hrusak, P. Scheier, T.D. Maerk, *J. Phys. Chem.* 108 (2004) 6562.
- [30] K. Aflatooni, A.M. Scheer, P.D. Burrow, *J. Chem. Phys.* 92 (2004) 168103.
- [31] J. Kopyra, I. Szamrej, K. Graupner, L.M. Graham, T.A. Field, P. Sulzer, S. Denifl, T.D. Maerk, P. Scheier, I.I. Fabrikant, M. Braun, M.-W. Ruf, H. Hotop, *Int. J. Mass Spectrom.*, 277 (2008) 130.
- [32] A.O. Colson, B. Besler, M.D. Sevilla, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 9787.
- [33] J. Berdys, I. Anusiewicz, P. Skurski, J. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6441.
- [34] X. Li, M. Sevilla, L. Sanche, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 13668.
- [35] I. Dąbkowska, J. Rak, M. Gutowski, *Eur. Phys. J. D* 35 (2005) 429.
- [36] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, E. Fischbach, J. Scheike, E. Illenberger, *Chem. Phys. Lett.* 387 (2004) 267.
- [37] S. Ptasińska, S. Denifl, S. Gohlke, P. Scheier, E. Illenberger, and T.D. Maerk, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 1893.
- [38] I. Bald, I. Dąbkowska, and E. Illenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 8518.
- [39] V.V. Golovlev, S.L. Allman, W.R. Garrett, N. I. Taranenko, C.H. Chen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 169/170 (1997) 69.
- [40] P. Sulzer, S. Ptasińska, F. Zappa, B. Mielewska, A.R. Milosavljevic, P. Scheier, T.D. Maerk, I. Bald, S. Gohlke, M.A. Huels, E. Illenberger, *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 044304.
- [41] S.G. Ray, S.S. Daube, R. Naaman, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 102 (2005) 15.
- [42] B.D. Michael and P.A. O'Neill, *Science* 287 (2000) 1603.
- [43] M. Gutowski, P. Skurski, J. Simons, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 10159.
- [44] J. Rak, P. Skurski, J. Simons, M. Gutowski, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 11695.
- [45] S. Gohlke, A. Rosa, E. Illenberger, F. Brüning, M.A. Huels, *J. Chem. Phys.* 116 (2002) 10164.

-
- [46] S. Ptasińska, S. Denifl, A. Abedi, P. Scheier, T.D. Maerk, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 1115.
- [47] S. Ptasińska, S. Denifl, P. Candori, S. Matejcik, P. Scheier, T.D. Maerk, *Chem. Phys. Lett.* 403 (2005) 107.
- [48] I. Martin, T. Skalicki, J. Langer, H. Abdoul-Carime, G. Karwasz, E. Illenberger, M. Stano, S. Matejcik, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7 (2005) 2212.
- [49] P. Papp, J. Urban, S. Matejcik, M. Stano, O. Ingolfsson, *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 204301.
- [50] P. Papp, P. Shchukin, and S. Matejcik, *J. Chem. Phys.* 132 (2010) 014301.
- [51] R. Abouaf, *Chem. Phys. Lett.* 451 (2008) 25.
- [52] G.A. Gallup, P.D. Burrow, I.I. Fabrikant, *Phys. Rev.* 79 (2009) 042701.
- [53] V. Vizcaino, B. Puschnigg, S.E. Huber, M. Probst, I.I. Fabrikant, G.A. Gallup, E. Illenberger, P. Scheier, S. Denifl, *New J. Phys.* 14 (2012) 043017.
- [54] Y. Vasil'ev, B.J. Figard, D.F. Barofsky, M.L. Deinzer, *Int. J. Mass Spectrom.* 268 (2007) 106.
- [55] D. Gschliesser, V. Vizcaino, M. Probst, P. Scheier, and S. Denifl, *Chem. Eur. J.* 18 (2012) 4613.
- [56] M.V. Muftakhov, P.V. Shchukin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 4600.
- [57] K. Aflatooni, B. Hitt, G.A. Gallup, P.D. Burrow, *J. Chem. Phys.* 115 (2001) 6489.
- [58] M. Sobczyk, I. Anusiewicz, J. Berdys-Kochanska, A. Sawicka, P. Skurski, J. Simons, *J. Phys. Chem. A* 109 (2005) 250.
- [59] C.W. Bokwalter, D.L. Zoller, P.L. Ross, M.V. Johnston, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6 (1995) 872.
- [60] The NIST chemistry webbook: <http://webbook.nist.gov/chemistry>.
- [61] S. Denifl, H.D. Flosadottir, A. Edtbauer, O. Ingolfsson, T.M. Maerk, P. Scheier, *Eur. Phys. J. D* 60 (2010) 37.
- [62] R.H. Garrett, C.M. Grisham, *Biochemistry*, Harcourt Inc., Orlando, FL, 1999.
- [63] F.A. Gianturco, R.R. Lucchese, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 7056.
- [64] I. Baccarelli, A. Grandi, F.A. Gianturco, R.R. Lucchese, N. Sanna, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 26240.
- [65] J. Rak, P. Skurski, M. Gutowski, *J. Chem. Phys.* 114 (2001) 10673.
- [66] A.M.J. Fichtinger-Schepman, A.T. van Oosterom, P.H.M. Lohman, F. Berends, *Cancer Res.* 47 (1987) 3000.

-
- [67] V. Brabek in *Platinum-based drugs in cancer therapy*, edited by L.R. Kelland, N. Farrell, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2001.
- [68] Y. Zheng, D.J. Hunting, P. Ayotte, and L. Sanche, *Phys. Rev. Lett.* 100 (2008) 198101.
- [69] R. Carey, R.R. Lucchese, and F.A. Gianturco, *J. Chem. Phys.* 138 (2013) 204308.
- [70] L.G. Christophorou, ed., *Electron-Molecule Interactions and their Applications*, vol. II, Academic Press, Orlando, 1984.
- [71] E. Illenberger and J. Momigny, *Gaseous Molecular Ions, An Introduction to Elementary Processes Induced by Ionization*, Steinkopff Verlag, Darmstadt, Springer Verlag, New York, 1992.
- [72] M. Jungen, J. Vogt, and V. Staemmler, *Chem. Phys.* 37 (1979) 46.
- [73] H. Adaniya, B. Rudek, T. Osipov, D.J. Haxton, T. Weber, T.N. Rescigno, C.W. Mc Curdy, and A. Belkacem, *Phys. Rev. Lett.* 103 (2009) 233201.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

Działalność naukowo-badawczą rozpoczęłam w Katedrze Chemii Fizycznej Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach (ówczesna Wyższa Szkoła Rolniczo-Pedagogiczna w Siedlcach, WSRP) w roku 1995, gdzie wykonałam pracę magisterską na temat „Oddziaływanie elektronów termicznych w fazie gazowej: układy zawierające CF_3Cl , CH_2F_2 , CHF_3 ”. Była to praca eksperymentalna i dotyczyła oddziaływania elektronów termicznych z halogenopochodnymi metanu. W pracy określiłam mechanizm i wyznaczyłam stałe szybkości reakcji wychwytu elektronów w układach dwuskładnikowych dwutlenek węgla-halogenopochodna metanu odpowiednio CH_2F_2 , CHF_3 oraz CClF_3 .

W roku 1995 zostałam zatrudniona w WSRP (obecnie UPH) na etacie asystenta w Katedrze Chemii Fizycznej. Pracę doktorską wykonałam pod kierunkiem prof. I. Szamrej-Foryś. Dotyczyła ona zagadnienia wpływu struktury cząsteczki na mechanizm i kinetykę procesu wychwytu elektronu. W ramach pracy przeprowadziłam badania strukturalnie podobnych cząsteczek, różniących się liczbą i położeniem atomów halogenów. Moim celem było określenie mechanizmu i zbadanie kinetyki procesu

wychwytu elektronów termicznych przez szereg halogenopochodnych węglowodorów nasyconych oraz powiązanie otrzymanych wyników ze strukturą cząsteczki.

W ramach pracy udoskonalona została technika pomiarowa poprzez modyfikację stosowanej metody obłoku elektronowego (przede wszystkim układu rejestrującego). Opracowanie i przetestowanie zmodyfikowanej techniki pomiarowej stanowiło istotną część mojej pracy doktorskiej.

W efekcie mojej pracy udoskonalona została metodyka pomiaru szybkości wychwytu elektronu w impulsowej komorze jonizacyjnej. Zmierzone zostały stałe szybkości procesu wychwytu elektronów termicznych przez szereg halogenopochodnych etanu i propanu. Należy podkreślić, iż pochodne propanu zbadane zostały po raz pierwszy. Zaproponowana została empiryczna zależność stałej szybkości wychwytu elektronów od polaryzowalności atomów halogenów biorących udział w procesie wychwytu, α_{centr} . Stwierdzono również, że wzrost polaryzowalności cząsteczki powoduje obniżenie energii aktywacji procesu wychwytu. Wykazano, że zmiana długości (pękającego) wiązania w cząsteczce spowodowana przyłączeniem nadmiarowego elektronu jest tym mniejsza, im większe jest α_{centr} .

W dalszym etapie mojej pracy naukowej badania dotyczyły wpływu temperatury na efektywność procesu wychwytu elektronu. Aby możliwe było prowadzenie pomiarów w warunkach kontrolowanych (przede wszystkim precyzyjny pomiar temperatury oraz wzmocnienie rejestrowanego sygnału) niezbędna była kolejna modyfikacja metodyki pomiarowej. Wiązało się to zarówno z wymianą komory reakcyjnej jak również zmianą sposobu generacji obłoku elektronowego. W nowym aparacie do generacji obłoku elektronów wykorzystano laser Nd:YAG dzięki czemu intensywność rejestrowanego sygnału wzrosła około tysiąckrotnie. Obecnie możliwe jest wyznaczanie stałych szybkości z dużo większą precyzją. Jednocześnie dzięki dużo wyższej intensywności rejestrowanego sygnału czas pomiaru został znacząco skrócony w związku z czym możliwe jest wykonanie całej serii pomiarów temperaturowych w ciągu jednego dnia co również wpływa na jakość wyników eksperymentalnych.

Wykorzystując zmodyfikowaną aparaturę zmierzono zależności stałych szybkości reakcji wychwytu w funkcji temperatury dla szeregu halogenopochodnych węglowodorów nasyconych oraz perfluoroeterów oraz wyznaczono energie aktywacji procesu (IJMS 2007; IJMS 2008; IJMS 2010; CPL 2012). W efekcie, po raz pierwszy zaproponowano zależność stałej szybkości reakcji wychwytu elektronu od energii aktywacji, która została

szczegółowo przedyskutowana w pracach opublikowanych w IJMS 2007, IJMS 2010 oraz JCP 2011.

Równolegle w ramach współpracy z prof. E. Illenbergerem z Freie Universitat Berlin prowadziłam badania metodą komplementarną (*beam*) umożliwiającą określenie produktów procesu wychwytu w obszarze niskich energii elektronów (<12 eV). Wynikiem tej współpracy było opublikowanie szeregu prac dotyczących między innymi fragmentacji acetamidu i jego pochodnych (PCCP 2008), halogenopochodnych kwasów organicznych (IJMS 2009; JCP 2010; JCP 2011) oraz fluoropochodnych etenu i etynu (ZPCh 2011). Należy tutaj nadmienić iż realizacja prac stanowiących cykl habilitacyjny częściowo możliwa była dzięki nawiązanej przeze mnie współpracy z prof. E. Illenbergerem.

Od 2009 roku dysponuję w moim laboratorium aparatem do prowadzenia badań produktów wychwytu elektronów metodą *beam*. Dzięki temu mogłam kontynuować rozpoczęte w Berlinie badania dotyczące oddziaływania biocząsteczek z niskoenergetycznymi elektronami. Przeprowadziłam między innymi badania dla szeregu aminokwasów tj. *N*-metyloglicyna, *N*-metyloalanina (CPL 2012), *L*-alanyloglicyna (CPL 2012), metionina (PCCP 2012), asparagina, kwas asparaginowy (praca w przygotowaniu) oraz *N,N,N*-trimetyloglicyna (JCP 2010). Po raz pierwszy zbadalam oddziaływanie elektronów z nukleotydem dCMP w fazie gazowej co pozwoliło na określenie względnych udziałów proponowanych mechanizmów w uszkodzeniach DNA (PCCP 2012).

Kontynuacją powyższej tematyki są badania przeprowadzone dla szeregu nukleozydów 2'-deokycytydyny, 2'-deoxy-5-fluorocytydyny oraz 2',2'-difluorocytydyny. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziliśmy, że podstawienie fluoru albo w grupie cukrowej albo zasadzie azotowej ma wpływ nie tylko na wydajność określonych ścieżek fragmentacji ale przede wszystkim na wydajność określonych rezonansowych stanów anionowych powstających w wyniku przyłączeniem nadmiarowego elektronu (RSC Adv., 2014). Nukleozyd uracylu badałam natomiast w ramach współpracy z grupą prof. P. Lima-Vieira z Universidade Nova de Lisboa w Lizbonie. Badania wykonane zostały metodą *beam* polegającą, w tym przypadku, na zderzeniu atomów potasu o energii z zakresu 30-100 eV z cząsteczkami urydyny. W wyniku zderzenia następuje przeniesienie elektronu z potasy do badanej cząsteczki i utworzenie TNI. Głównymi obserwowanymi jonami fragmentarycznymi były (M-H)⁻, OCN⁻, OH⁻ oraz O⁻ (D. Almeida, F. Ferreira da Silva, J. Kopyra, G. Garcia and P. Limão-Vieira, "Anion formation in gas-phase potassium-uridine collisions", praca wysłana do IJMS). Na podkreślenie zasługuje fakt, że

zarówno w eksperymencie polegającym na bezpośrednim zderzeniu elektronu z cząsteczką jak i przeniesieniu elektronu z atomu potasu do cząsteczki, proces tworzenia jonów fragmentarycznych związany jest z pęknięciem wiązania N-glikozydowego.

Kolejny projekt dotyczy dysocjacyjnego wychwytu elektronu przez metylowe pochodne tiouracylu występujące albo w formie *keto* albo *enol* (jedna praca w druku, kolejne dwie prace w przygotowaniu). Dzięki nawiązanej współpracy z grupą prof. P. Skurskiego z Uniwersytetu Gdańskiego możliwe było nie tylko określenie ścieżek fragmentacji 5-metylo-2-tiouracylu ale również, na podstawie obliczeń kwantowochemicznych, zaproponowanie mechanizmy tworzenia rezonansowych stanów anionowych w obszarze energii < 3 eV (J. Kopyra, S. Freza, H. Abdoul-Carime, M. Marchaj, P. Skurski, "Dissociative electron attachment to gas phase thiothymine: experimental and theoretical approach", PCCP, DOI:10.1039/C3CP54966F).

Inny projekt obejmował badania procesów wychwytu elektronów przez perfluoropochodne węglowodorów zarówno o strukturze łańcuchowej jak i cyklicznej (IJMS 2012). Okazało się, że badane związki ulegają fragmentacji przede wszystkim w obszarze energii < 4 eV w wyniku czego powstają zamkniętopowłokowe jony ujemne o ogólnym wzorze sumarycznym $C_nF_{2n+1}^-$. Projekt ten realizowany był we współpracy z dr S. Karolczakiem z MITR w Łodzi (eksperyment przeprowadzony w moim laboratorium). Ponadto w ramach współpracy z dr S. Karolczakiem oraz dr hab. M. Wolszczakiem prowadzone są badania procesów przyłączenia (swobodnego lub solwatowanego) elektronu przez mocznik i jego pochodne metodą *beam* (moje laboratorium) w fazie gazowej oraz metodą radiolizy impulsowej (MITR, Łódź) w fazie ciekłej (projekt trwający).

Kopyra