

Energioverføring mellom histoner og DNA

ESR-studier av radikaldannelse i komplekskrystaller av glysin og cytosin

av

Randi Vågane

Hovedoppgave i fysikk

Høsten 2002



Fysisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo

Forord

Arbeidet med denne oppgaven startet ved biofysikkgruppen, Fysisk institutt, UiO, med de første forsøk på krystallgroing i januar 2001 og ble avsluttet med de siste beregninger i november 2002. Dagene har iblant vært preget av en fin forening av teori og praksis - *ingenting stemmer og ingen vet hvorfor*. Til tross for få og tidvis merkelige eksperimentelle resultater, ble dette sluttproduktet betraktelig tykkere enn jeg hadde forestilt meg. Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder, professor Einar Sagstuen og medveileder, professor Eli Olaus Hole, for oppmuntrende veiledning og god hjelp i alle faser av prosessen - eksperimenter, analyse og skriving. Alle andre på ESR-gruppen har også villig delt med meg av sine erfaringer og kunnskaper. Carl Henrik Gørbitz (Kjemisk institutt, UiO) takkes for å ha gjort røntgendiffraksjonsanalyse av krystaller av N-formylglysin og beskrevet krystallstrukturen, slik at jeg kunne få noe mer fornuftig ut av mine eksperimentelle resultater. Takk også til Liva som har lest korrektur på et uforståelig fagområde og sørget for middag når jeg har hatt det travelt. Til slutt vil jeg takke alle i biofysikkgruppen for et hyggelig, uformelt og inkluderende miljø, og alle andre som har gjort årene på Blindern trivelige og lærerike.

Blindern, november 2002

Randi Vågane

Sammendrag

DNA-heliksen i cellekjernen er under store deler av cellyklus kveilet opp og pakket sammen til en mer kompakt struktur ved hjelp av spesielle proteiner, *histoner*. Det er av interesse å undersøke muligheten for energioverføring mellom DNA-molekylet og histonene. Det er derfor gjort undersøkelser av radikaldannelse i enkrystaller av isolert N-formylglysin, samt i komplekskrystaller av cytosin og N-formylglysin. Dette er ett av svært få aminosyre-nukleinsyrekomponenter som har blitt rapportert. Krystallene ble bestrålt med ioniserende stråling (røntgen) og undersøkt ved romtemperatur ved hjelp av elektron spin resonans (ESR) spektroskopi, samt avledede teknikker (ENDOR og FSE). I tillegg ble det også gjort Density Functional Theory (DFT) molekylorbital-beregninger for å identifisere radikalstrukturen til det dominerende strålingsinduserte radikalet som stabiliseres ved romtemperatur, både i isolert N-formylglysin og i N-formylglysin-delen av komplekskrystallen. Dette radikalet er trolig et hydrogenabstraksjonsradikal som er vanlig å observere i glysin, glysinderivater og andre aminosyrer ved romtemperatur. I komplekskrystallen dannes i tillegg små mengder av kjente cytosinradikaler, hydrogenaddisjonsradikalene 5-yl og 6-yl. Simuleringer viser at også en bred singlett bidrar til spektrene. Denne singletten tilhører trolig cytosinmolekylet. Det har ikke vært mulig å entydig bestemme den relative radikalmengden for de fire radikalene i komplekskrystallen. Simuleringer antyder likevel at singletten bidrar så mye til spektrene at det totalt sett dannes mer av cytosinradikalene enn av glysinradikalet. Dette gir muligheter for at det kan ha funnet sted en overføring av elektroner mellom aminosyren og DNA-basen. En slik overføring av spin-funksjon fra DNA-bundne histoner til DNA-molekylet kan bety at histonene *ikke* gir noen signifikant beskyttelse av DNA-molekylet mot ioniserende stråling.

Innhold

1	Innledning	1
1.1	Stråling og radikaldannelse	1
1.2	DNA og histoner.....	3
2	Teori.....	7
2.1	ESR - Electron Spin Resonance	7
2.2	ENDOR - Electron Nuclear DOuble Resonance.....	15
2.3	FSE - Field-Swept ENDOR.....	16
3	Metoder.....	17
3.1	Krystaller	17
3.2	Krystallorientering og røtgendiffraksjon.....	18
3.3	Røntgenbestråling.....	19
3.4	N-formylglysin	19
3.5	Cytosin:N-formylglysin.....	21
3.6	ESR-eksperimentet	23
3.7	DFT - Density Functional Theory	25
3.8	Andre programmer	27
4	N-formylglysin	29
4.1	ESR-resultater.....	29
4.2	ENDOR-resultater	33
4.3	FSE	39
4.4	Radikalstruktur	40

5	Cytosin:N-formylglysin	49
5.1	ESR-resultater	49
5.2	Radikal i aminosyredelen	53
5.3	Cytosinradikaler.....	61
5.4	Simuleringer	64
6	Oppsummering og diskusjon	69
6.1	Glysinradikal.....	69
6.2	Cytosinradikaler.....	73
6.3	Spinoverføring	75
6.4	Forslag til videre arbeid	80
	Referanser	81
	Appendiks.....	87
A	DFT - inputfil.....	87
B	Simuleringsfil for komplekskrystallen	88
C	Krystallografiske data.....	90

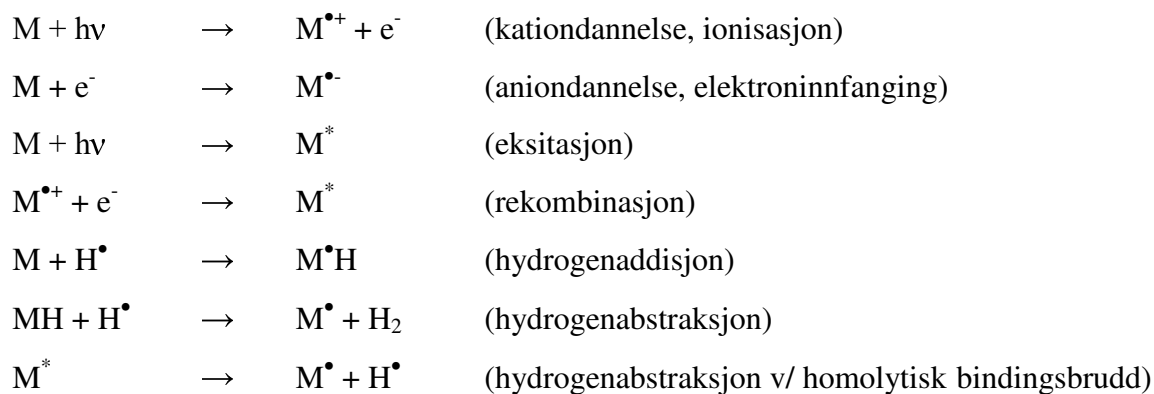
1 Innledning

Hver dag utsettes vi for stråling fra naturlige og antropogene kilder. Ioniserende stråling eksponeres vi for blant annet i form av røntgenstråling og stråling fra radioaktive stoffer. Det er derfor viktig å forstå hvordan slik stråling påvirker biologiske systemer. Det har lenge vært kjent at ioniserende stråling kan *forårsake* celleskader, celledød og kreft (1), samtidig som slik stråling brukes til å *helbrede* kreft. En rekke studier av strålingseffekter på celler har gitt holdepunkter for at DNA-molekylet (deoxyribonucleic acid) er den mest strålefølsomme strukturen i cellen (2). Som et ledd i studiet av mekanismene for strålingsinduserte skader i DNA kan man undersøke radikaldannelse etter bestråling av ulike modellsystemer, for eksempel DNA-komponenter. ESR-spektroskopi og beslektede teknikker er hensiktsmessige for å identifisere og karakterisere radikaler som dannes i slike molekyler.

1.1 Stråling og radikaldannelse

Ioniserende stråling kan være *ladde partikler* - elektroner (β -stråling), protoner, heliumkjerner (α -stråling) eller tyngre kjerner, *nøytrale partikler* - nøytroner, eller *elektromagnetisk stråling* - fotoner (γ -stråling, røntgenstråling). Felles for disse er at de har nok energi til å løsribe elektroner fra molekyler slik at det dannes ioner. Dette skjer gjennom ulike typer vekselvirkninger mellom strålingen og molekylene. I det foreliggende arbeidet er det benyttet røntgenfotoner for å ionisere molekyler i krystaller. Røntgenstrålingen vekselvirker med materien i hovedsak gjennom fotoelektrisk effekt og comptonspredning (3). Ved røntgenbestråling vil i utgangspunktet alle deler av molekylet ha lik sannsynlighet for å bli truffet, men i de deler av molekylet hvor det er størst tetthet av valenselektroner er det også størst sannsynlighet for at det skal oppstå en ionisasjon.

I stabile molekylære systemer opptrer elektroner vanligvis parvis. Molekyler som har et uparet elektron kalles frie radikaler. Frie radikaler er reaktive og kan i sin tur forårsake skader på omgivelsene. Ved bestråling av biomolekyler vil det skje reaksjoner på flere måter og i flere steg etter at strålingsenergi ($h\nu$) absorberes av biomolekylene (M). Reaksjonsproduktene, med unntak av de eksiterte tilstandene M^* , er frie radikaler, M^\bullet :

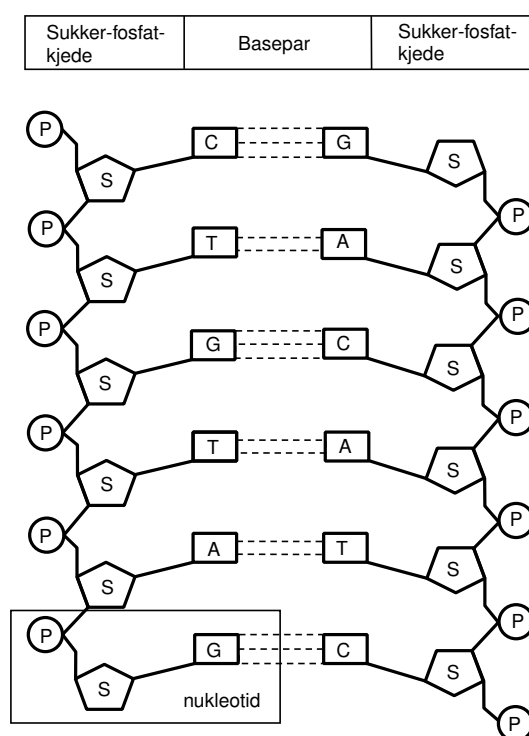


Et komplisert reaksjonsforløp følger etter bestrålingen før en eventuell skade fikseres eller repareres. I det *fysiske* stadiet vil strålingen treffe molekyler og absorberes. Det dannes ioner, eksiterte molekyler og frie radikaler i løpet av svært kort tid, gjerne 10^{-15} til 10^{-10} sekunder. I løpet av de påfølgende mikrosekunder til sekunder oppstår *kjemiske* endringer i makromolekyler (f.eks proteiner og DNA) og cellestrukturer. *Biologiske* effekter opptrer etter dager eller år, med celledød, mutasjon (varig forandring i basesekvensen) eller kreft som mulige konsekvenser.

De vekselvirkningsprosesser som forårsaker strålingsskader i DNA klassifiseres ofte som *direkte* eller *indirekte* effekter. Den direkte effekten knyttes til en direkte ionisering eller eksitasjon av selve DNA-molekylet. Resultatet av dette er dannelse av primære radikaler i DNA, skader som kan utløse serier av hendelser som til slutt kan forårsake en biologisk endring. Med indirekte effekt menes at strålingen vekselvirker med de molekyler som *omgir* DNA-molekylet, uten å være bundet til det, og danner frie radikaler. Først og fremst domineres denne effekten av de svært reaktive vannradikalene som dannes, OH^\bullet , e^- og H^\bullet , og som igjen i sin tur diffunderer til og overfører skaden sin til DNA-molekylet. I mer komplekse systemer, som for eksempel celler, kan skader også skyldes bestråling av molekyler som er *bundet* til DNA. Dette kalles en *kvasi-direkte effekt*. I denne kategorien finnes de DNA-bundne *histonene* sammen med vann og andre proteiner. Disse kan overføre elektroner og/eller hull (elektronvakanser) til DNA-molekylet eller senere reagere ved kryssbinding og hydrogenabstraksjon. I alle disse tre situasjonene vil elektroner og hull kunne vandre over større avstander slik at skader fikseres langt fra der hvor strålingen opprinnelig traff. Det antas at 30-50 % av skader forårsaket av ioniserende stråling skyldes den direkte eller kvasi-direkte effekten, mens 50-70 % skyldes indirekte effekter (4).

1.2 DNA og histoner

I kroppens cellekjerner finnes molekyler av DNA (deoksyribonukleinsyre), som bærer den genetiske informasjonen. Dersom DNA-molekylet påføres en skade som ikke repareres, kan cellen endre sin funksjon eller den kan dø. DNA-molekylet består av en dobbeltheliks der sukker-fosfat-kjeder (S-P i figur 1.1) utgjør to antiparallelle spiraltråder. Basepar av en purinbase og en pyrimidinbase, Guanin-Cytosin og Adenin-Tymin, binder sammen de to spiraltrådene. Denne strukturen ble først beskrevet i 1953 av Watson og Crick (5).



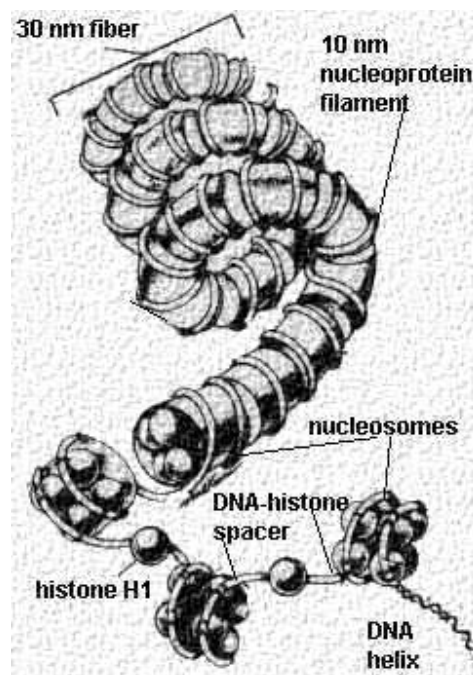
Figur 1.1: DNA-molekylets byggesteiner.

Det finnes flere typer skader som kan oppstå i DNA-molekyler. Vanlige skader i forbindelse med ioniserende stråling er *trådbrudd* – brudd i sukker-fosfatkjeden. Ved enkeltrådbrudd oppstår det et brudd i den ene tråden. Ved dobbeltrådbrudd oppstår det brudd i begge de to parallelle spiraltrådene slik at dobbeltheliksen brytes opp i flere biter. Andre vanlige skader som oppstår er dannelse av *pyrimidindimerer*, det vil si at to etterfølgende pyrimidinbaser (C og/eller T) bindes sammen. Det forekommer også *baseskader*, i form av små eller store forandringer i basene, som igjen er utgangspunkt for mutasjoner. Både baseskader og enkeltrådbrudd vil ofte kunne repareres, mens dobbeltrådbrudd repareres sjeldnere.

Når et molekyl utsettes for ioniserende stråling, blir elektroner slått løs. Noe av den energien som strålingen tilfører molekylet går med til løsrivningsarbeid. Dersom et elektron etter løsrivningen fortsatt har nok energi, kan det begynne en vandring rundt i omgivelsene. Avhengig av størrelsen på den kinetiske energien kan denne vandringen forårsake enten videre sekundære ionisasjoner eller innfangning og aniondannelse. På denne måten kan elektronene forårsake skader langt fra der hvor de først ble slått løs. Blant komponentene som inngår i DNA-molekylet er det sukker/fosfat-gruppen som har den høyeste tettheten av valenselektroner. Det antas derfor at det er en noe høyere ionisasjonstetthet i spiraltrådene enn det er i basene. Studier av radikaldannelse i DNA-komponenter gir holdepunkter for at elektroner og hull migrerer fra sukker/fosfat-gruppene til basene hvor de stabiliseres i de energetisk mest gunstige posisjonene. Ofte vil elektroner etter innfangning transporteres til og stabiliseres i cytosin, som er den av basene som har høyest elektronaffinitet. Hull stabiliseres gjerne i guanin, som er den basen med lavest ionisasjonspotensiale (4).

DNA-tråden er tynn og lang, i mange organismer ca 2 m, og vil derfor være utsatt for skader. For å oppta mindre plass og for å beskyttes, blant annet mot nukleaser (enzymer som bryter ned nukleinsyre), er dobbeltheliksen under store deler av cellesyklus kveilet opp sammen med vannmolekyler til mer kompakte strukturer, kalt *nukleosomer*. Dette skjer ved hjelp av noen spesielle proteiner som kalles *histoner*. Nukleosomene, som utgjør grunnenhetene i kromosomene, består av to av hver av de nukleosomale histonene H2A, H2B, H3, og H4 som til sammen danner en oktamer med diameter omkring 10 nm som dobbeltheliksen kveiles rundt to ganger (figur 1.2). Ved hjelp av den siste histontypen, H1, pakkes nukleosomene sammen til en nukleoprotein-fiber med diameter 30 nm (1). Histonene er relativt små proteiner som består av en stor andel positivt ladde aminosyrer som arginin og lysin. Både arginin og lysin har sidekjeder med ledige aminogrupper som lett trekker til seg protoner og dermed blir positivt ladde. DNA-molekylet er negativt ladd ettersom fosfatgruppene i spiraltråden er negativt ladet. Denne ladningsforskjellen gjør at sterke hydrogenbindinger kan binde sammen histoner og DNA helt uavhengig av nukleotidsekvensen (baserekkefølgen). Det er også hydrogenbindinger mellom aminosyrenes hovedkjeder og fosfatgruppene i DNA-molekylet, samt ikke-polare kontakter mellom aminosyrene og sukkergruppene (6). I nukleosomene er omtrent halvparten av fosfatgruppene negative elektriske ladning nøytralisert av de positivt ladde aminosyrene. Resten av fosfatladningen er ledig for interaksjoner med andre

proteiner eller ioner. Histon-massen og DNA-massen i kromosomet utgjør samme størrelsesorden. I tillegg inneholder kromosomene store mengder vann. De nukleosomale histonene er sterkt konserverte gjennom evolusjonen, og man antar derfor at deres funksjon involverer nesten alle aminosyrene de er bygget opp av. H1-histonet har en større masse, og dets aminosyresekvens er i mindre grad bevart (1).



Figur 1.2: DNA-oppkveiling ved hjelp av histoner. Figuren er hentet fra (7).

Det er av interesse å undersøke mulighetene og eventuelle mekanismer for energioverføring mellom DNA og histoner. En hypotese om elektronoverføring fra proteinkomponenter til DNA ble framsatt allerede i 1961 av Alexander *et al.* (8) etter ESR-studier av γ -bestrålte nukleoproteiner. De fleste undersøkelser som er gjort på dette området innebærer studier av kromatin, histoner og DNA hentet fra celler. Weiland og Hüttermann (9) har gjennomgått en del aktuelle arbeider som alle konkluderer med at det er en overføring av energi *fra* protein *til* DNA. Slike naturlige DNA-histon komplekser er relativt kompliserte strukturer, det er derfor ønskelig å undersøke enklere modellsystemer for om mulig å finne energioverføring mellom histoner og byggesteiner i DNA. En enkel krystallmodell av denne typen er komplekser av en nukleinsyrebase og en aminosyre. Det er imidlertid vanskelig å få til en ko-krystallisering av disse på grunn av ulike fysio-kjemiske egenskaper som for eksempel løselighet (10). Tamura *et al.* (11) har gjennom systematiske undersøkelser av kompleksdannelser mellom biologisk relevante molekyler funnet at N-acylering (addisjon av en RCO-gruppe på nitrogenatomet) av aminosyrer gjør

en slik ko-krystallisering mulig. Acyleringen på nitrogenatomet reduserer aminogrubbens evne som proton-akseptor på grunn av dannelse av en peptidbinding. Karboksylgruppen kan dermed donere et proton til andre grupper enn aminogruppen, for eksempel til et cytosin-molekyl. I det foreliggende arbeidet er komplekskrystaller av DNA-basen cytosin og aminosyrederivatet N-formylglysin (cytosin:N-formylglysin, C:NFG) studert. Glysin er den enkleste aminosyren. Ved å addere en formylgruppe HCO (enkliste acylgruppe) til glysinets nitrogenatom, fås N-formylglysin (NFG) som kan danne komplekskrystaller sammen med cytosin.

Det er viktig å ha kjennskap til radikaldannelsen i de to separate komponentene for å kunne forstå resultatene fra komplekskrystallen. N-formylglysin var ikke undersøkt tidligere og måtte derfor studeres separat, mens det tidligere er gjort mange ESR-studier av bestrålte enkrystaller av cytosinderivater (12-15). Undersøkelsene er gjort ved hjelp av ESR-spektroskopi og avledede teknikker (ENDOR, FSE). De fleste eksperimentene er gjennomført ved romtemperatur. Dette innebærer at man bare kan observere de mest stabile radikalene, men samtidig er denne temperaturen biologisk mer realistisk.

2 Teori

De eksperimentelle metodene benyttet i det foreliggende arbeidet er ESR-spektroskopi og de avledede teknikkene ENDOR og FSE. Dette kapitlet tar bare for seg noe av den grunnleggende teorien bak disse teknikkene. En mer utførlig beskrivelse kan finnes i flere lærebøker som f.eks Atherton (16) eller Gordy (17).

2.1 ESR - Electron Spin Resonance

Resonansfenomenet

Vekselvirkning mellom elektron og magnetfelt

Elektromagnetiske vekselvirkninger på et mikroskopisk nivå må beskrives kvantemekanisk, der impuls og posisjon erstattes med operatorer. Energien til et system uttrykkes ved forventningsverdien til Hamiltonoperatoren, $\langle \mathcal{H} \rangle$, som tilsvarer egenverdiene E i Schrödingerligningen

$$\mathcal{H}\Psi_n = E_n\Psi_n \quad (2.1)$$

der Ψ_n er systemets egentilstander.

Når atomer eller molekyler utsettes for ioniserende stråling, kan elektroner løsrives og det dannes, som skissert i kapittel 1.1, radikaler, molekyler med uparede elektroner.

Elektroner har et egenspinn som kan uttrykkes ved operatoren \mathbf{S} , der egenverdiene for \mathbf{S}^2 er $S(S+1)\hbar^2$. Komponenten av \mathbf{S} i en gitt retning, f.eks. \mathbf{S}_z , har egenverdiene $\hbar m_s$, der m_s kan ta verdiene $-S, -S+1, -S+2, \dots, S-1, S$. Elektroner har $S = \frac{1}{2}\hbar$ og kan derfor befinne seg i en av to spinntilstander (egentilstander for en-elektronsystemer). Tilstanden $m_s = \frac{1}{2}\hbar$ kalles gjerne $|\alpha\rangle$, parallell eller ”spinn opp”, $|\uparrow\rangle$, mens tilstanden $m_s = -\frac{1}{2}\hbar$ betegnes $|\beta\rangle$, antiparallell eller ”spinn ned”, $|\downarrow\rangle$. Denne oppsplittingen i to nivåer kalles Zeemansplitting. Vekselvirkningen mellom et uniformt magnetfelt og en magnetisk dipol, for eksempel et elektron, uttrykkes klassisk ved

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B} \quad (2.2)$$

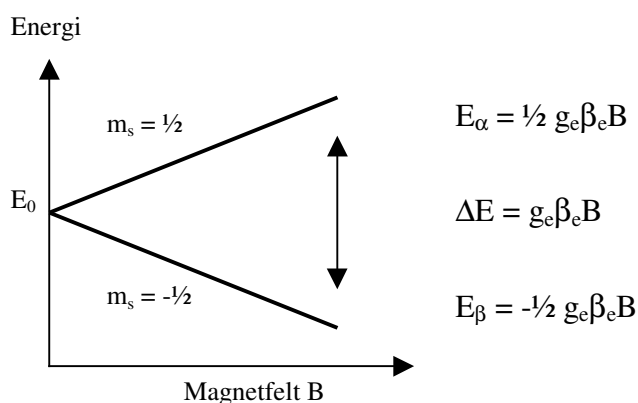
der $\boldsymbol{\mu}$ er det magnetiske moment og \mathbf{B} er magnetfeltet. Frie elektroners magnetiske moment kan uttrykkes ved $\boldsymbol{\mu} = -g_e\beta_e\mathbf{S}$. Her er g -faktoren $g_e = 2.0023$, og β_e er

Bohrmagnetonet ($\beta_e = e/2m_e$, der e er elementærladningen og m_e er elektronmassen). Hamiltonoperatorens Zeeman-ledd for vekselvirkning mellom et elektron og magnetfeltet er da

$$\mathcal{H}_{Zee} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B} = g_e \beta_e \mathbf{S} \cdot \mathbf{B} = g_e \beta_e B S_z \quad (2.3)$$

når det ytre magnetfeltets retning definerer z -aksen, $\mathbf{B} = B \cdot \mathbf{k}$. Løser vi de tidsuavhengige Schrödinger-ligningene for frie elektroner, $\mathcal{H}_{Zee}|\alpha\rangle = E_\alpha|\alpha\rangle$ og $\mathcal{H}_{Zee}|\beta\rangle = E_\beta|\beta\rangle$, finner vi energi-eigenverdiene til de to spinntilstandene $E_\alpha = \frac{1}{2} g_e \beta_e B$ for α -elektroner og $E_\beta = -\frac{1}{2} g_e \beta_e B$ for β -elektroner. Som vist i figur 2.1 er energiforskjellen mellom de to energinivåene E_α og E_β da

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = \frac{1}{2} g_e \beta_e B - (-\frac{1}{2} g_e \beta_e B) = g_e \beta_e B \quad (2.4)$$



Figur 2.1: Energinivåer som funksjon av magnetfelt.

Spinn-populasjon

Elektroner er fermioner, og i følge Fermi-Dirac-statistikk er sannsynligheten for å finne elektronet i tilstand Ψ_n med tilsvarende energi E_n gitt ved

$$p(E_n) \propto \frac{1}{e^{E_n/kT} + 1} \approx e^{-E_n/kT} \quad (2.5)$$

der T er absolutt temperatur og k er Boltzmannkonstanten. Med $E_\alpha > E_\beta$ vil det ved termisk likevekt være flere elektroner i β -tilstanden enn i α -tilstanden,

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} \sim e^{-\Delta E/kT} < 1 \quad (2.6)$$

Ved lavere temperaturer øker populasjonsforskjellen mellom tilstandene. Energigapet ΔE mellom nivåene er proporsjonalt med styrken på magnetfeltet (figur 2.1 og ligning 2.4). I

sterke magnetfelt vil det bli store energidifferanser og økt populasjonsforskjell. I ESR velges magnetfeltets størrelse B større enn 0.05 tesla, slik at det må benyttes mikrobølger for å indusere overganger mellom elektronenes spinntilstander. Mikrobølgefrekvensen holdes konstant, mens magnetfeltet sveipes. Når resonansbetingelsen, $h\nu = g_e\beta_e B$, er oppfylt, det vil si når systemet tilføres en energi som tilsvarer energidifferansen mellom spinntilstandene, kan det induseres absorpsjon eller emisjon. Siden det er flest elektroner i den laveste tilstanden (ligning 2.6) vil det være en netto absorpsjon. Denne absorpsjonen registreres som funksjon av magnetfelt.

Overgangssannsynlighet og relaksasjon

I ESR-spektroskopi vil energioverganger induseres av et lineærpolarisert magnetfelt \mathbf{B}_1 som står normalt på hovedmagnetfeltet. Zeeman-vekselvirkningen mellom elektronet og \mathbf{B}_1 gir opphav til en perturberende, tidsavhengig Hamiltonoperator, \mathcal{H}_1 . Fermis gyldne regel beskriver overgangssannsynligheten per tidsenhet for induserte overganger mellom $|\alpha\rangle$ og $|\beta\rangle$ som

$$\Gamma_{\alpha\beta}(\omega) = (2\pi/\hbar^2)|\langle\alpha|\mathcal{H}_1|\beta\rangle|^2 \delta(\omega-\omega_{\alpha\beta}) \quad (2.7)$$

Med den tidsuavhengige delen av \mathcal{H}_1 gitt som $g_e\beta_e B_1 \mathbf{S}_x$ (18) får vi for en ESR-overgang fra $|\alpha\rangle$ til $|\beta\rangle$ via heve- og senkeoperatorene

$$\langle\alpha|\mathbf{S}_x|\beta\rangle = 1/2 \langle\alpha|\mathbf{S}^+ + \mathbf{S}^-|\beta\rangle = 1/2 \quad (2.8)$$

som gir overgangssannsynligheten

$$\Gamma(\omega) = (2\pi/\hbar^2) (1/2 g_e\beta_e B_1)^2 \delta(\omega-\omega_{\alpha\beta}) \quad (2.9)$$

Diracs deltafunksjon, $\delta(\omega-\omega_{\alpha\beta})$, i ligning 2.9 viser at det bare kan finne sted stimulerte overganger mellom spinntilstandene α og β når $\hbar\omega = \hbar\omega_{\alpha\beta} = E_\alpha - E_\beta = g_e\beta_e B$, det vil si når resonansbetingelsen er oppfylt. Overgangssannsynligheten er også avhengig av B_1^2 , og dermed av energitettheten til det elektromagnetiske strålingsfeltet. Ligning 2.9 viser også at sannsynligheten er lik for emisjon og absorpsjon. For spontane overganger er det ikke slik. Der er den totale overgangssannsynlighet per tidsenhet

$$W = W_{\alpha\rightarrow\beta} + W_{\beta\rightarrow\alpha} = 1/T_1 \quad (2.10)$$

T_1 kalles spinn-gitter-relaksasjonstid og denne relaksasjonen kan ses på som en prosess der tidsvariable felt fra omgivelsene (gitteret) forårsaker spinnoverganger, nå med ulik

sannsynlighet for overganger opp og ned. Samtidig er det en populasjonsforskjell mellom energinivåene, $n_\alpha \neq n_\beta$. Ved likevekt opprettholdes denne ved relasjonen

$$n_\beta W_{\beta \rightarrow \alpha} = n_\alpha W_{\alpha \rightarrow \beta} \quad (2.11)$$

Når B_1 -feltet utjevner populasjonsforskjellen vil systemet motvirke dette ved å overføre energi til omgivelsene ved spinn-gitter-relaksasjon. En annen relaksasjonsprosess uten energiutveksling er spinn-spinn-relaksasjon, karakterisert ved relaksasjonstiden T_2 . Dette er et uttrykk for graden av defasing av netto magnetisering i xy -planet. Denne prosessen skyldes magnetiske variasjoner i omgivelsene som forårsaker en fordeling av frekvenser ω , noe som gir opphav til økt linjebredde i ESR-spekteret.

Kjerne i magnetfelt

Kjernenes analog til elektronenes egenspinn er kjernespinnet. Dette uttrykkes ved operatoren \mathbf{I} . For kjerner som har $I > 0$ vil det være en oppsplitting, på tilsvarende måte som for elektroner, i to eller flere tilstander avhengig av størrelsen til egenspinnet ($m_I = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I$). Kjerner har vanligvis kjernespinn $I = 0, 1/2, 1$ eller $3/2 \hbar$. Tilsvarende har også kjerner et magnetisk moment, $\mu = g_N \beta_N \mathbf{I}$, der g_N for protoner er 5.585 og kjernemagnetonet $\beta_N = e/2m_p$, der m_p er protonmassen. Dermed blir kjerne-Zeeman-leddet

$$\mathcal{H}_{nuc-Zee} = -\mu \cdot \mathbf{B} = -g_N \beta_N \mathbf{I} \cdot \mathbf{B} = -g_N \beta_N B I_z \quad (2.12)$$

når det ytre magnetfeltets retning definerer z -aksen, $\mathbf{B} = B \cdot \mathbf{k}$.

Uparede elektroner i molekylære omgivelser

For molekylære systemer med mange elektroner og kjerner vil hamiltonoperatoren ha en mer kompleks form på grunn av elektronenes og kjernenes innbyrdes vekselvirkninger. Hamiltonoperatoren inneholder ledd for kinetisk og potensiell energi, i tillegg til spinn-ledd for ulike typer vekselvirkninger mellom magnetfelt, elektroner og kjerner. For et to-spinn system med ett elektron og ett proton vil spinndelen av Hamiltonoperatoren være

$$\mathcal{H}_{spinn} = \beta_e \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{g}} \cdot \mathbf{B} - g_N \beta_N \mathbf{I} \cdot \mathbf{B} + \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{A}} \cdot \mathbf{I} + \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{D}} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{I} \cdot \hat{\mathbf{P}} \cdot \mathbf{I} \quad (2.13)$$

Vanligvis er det bare de tre første leddene som er relevante (Zeeman-leddet, kjerne-Zeeman-leddet og hyperfinvekselvirkningen mellom elektron og kjerne). Det nest siste

leddet, elektron-elektron dipol-dipol termen, beskriver vekselvirkningen mellom to uparede elektronspinn og opptrer kun i spinnsystemer med $S \geq 1$. Det siste leddet beskriver kvadrupolkobling som skyldes (elektrostatisk) vekselvirkning mellom et elektron og kvadrupolmomentet til en kjerne. Dette gjelder bare for kjerner med $I \geq 1$ som har en ikke-sfærisk ladningsfordeling.

Spinn-bane-kobling

Elektroner som ikke er frie vil i tillegg til egenspinn \mathbf{S} også ha et banespinn \mathbf{L} .

Elektronets banebevegelse omkring en atomkjerne medfører en vekselvirkning mellom elektronets bane-impulsmoment og elektronspinn, såkalt spinn-bane-kobling.

Hamiltonoperatoren for denne koblingen er gitt ved $\mathcal{H}_{LS} = \lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$. Spinn-bane-koblingskonstanten λ avhenger både av atomtype og orbitaltype. Førsteordensbidraget fra spinn-bane-koblingen er null, men det blir et annenordens bidrag som gjør at den observerte g-faktor ikke lenger er lik g_e , samtidig som den vil kunne variere med systemets orientering i forhold til magnetfeltet. Elektron-Zeeman-leddet i

Hamiltonoperatoren skrives nå som

$$\mathcal{H}_{Zee} = \beta_e \mathbf{B} \cdot \hat{\mathbf{g}} \cdot \mathbf{S} \quad (2.14)$$

der g_e er erstattet med en tensor, $\hat{\mathbf{g}}$. Matriseelementene i denne anisotrope tensoren er gitt ved (18)

$$g_{ij} = g_e \delta_{ij} - 2 \sum_{n \neq 0} \frac{\sum_{\mu} \langle \psi_0 | \lambda_{\mu} L_{i\mu} | \psi_n \rangle \sum_{\nu} \langle \psi_n | L_{j\nu} | \psi_0 \rangle}{E_n - E_0} \quad (2.15)$$

der $|\psi_0\rangle$ og $|\psi_n\rangle$ er molekylorbitaler for et elektron i henholdsvis grunntilstand og n'te eksiterte tilstand med tilhørende energier E_0 og E_n . λ_{μ} er spinn-banekoblingskonstanten for atom μ , og $L_{i\mu}$ gir kun bidrag for orbitaler knyttet til atom μ . Kroneckerdeltaet δ_{ij} viser at g_e bare bidrar når $i=j$.

Hyperfinvekselvirkning

Hyperfin-termen beskriver den magnetiske vekselvirkningen mellom det uparede elektronspinn og kjernene. I hyperfintensoren \hat{A} inngår to ledd, et isotropt og et anisotropt bidrag. Det isotrope bidraget kalles gjerne Fermis kontaktvekselvirkning. Dette gir bidrag kun når elektrontilstanden er slik at elektronet *kan* befinne seg på kjernens

plass. Et eksempel er et elektron i et s-orbital, siden s-orbitaler er kulesymmetriske. En vekselvirkning mellom et elektron og en kjerne gir et kontaktvekselvirkningsledd $\mathcal{H}_k = a \mathbf{S} \cdot \mathbf{I}$, der a er den isotrope hyperfinkoblingskonstanten som i enkleste tilfelle (hydrogenatomet) er gitt ved

$$a = \frac{2\mu_0}{3} g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(\mathbf{r}_N)|^2 \quad (2.16)$$

der μ_0 er permeabilitetskonstanten og $|\psi(\mathbf{r}_N)|^2$ angir sannsynligheten for å finne elektronet på kjernens plass.

Det anisotrope bidraget skriver seg fra dipol-dipol vekselvirkninger mellom elektronets og kjernens magnetiske moment der det uparede elektronet befinner seg i orbitaler av p, d eller f-karakter. I slike orbitaler kan elektronet *ikke* finnes på kjernens plass. Dette leddet er retningsavhengig (anisotrop) og spinn-Hamiltonoperatoren for denne vekselvirkningen kan dermed skrives som $\mathcal{H}_{dd} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{A}^0 \cdot \mathbf{I}$, der tensorelementene til \mathbf{A}^0 er gitt ved

$$A^0_{ij} = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3ij - r^2 \delta_{ij}}{r^5} \right\rangle \quad (2.17)$$

Klammeparentesen angir integrasjon over elektronets romlige fordeling. Det totale hyperfin-leddet kan nå skrives som

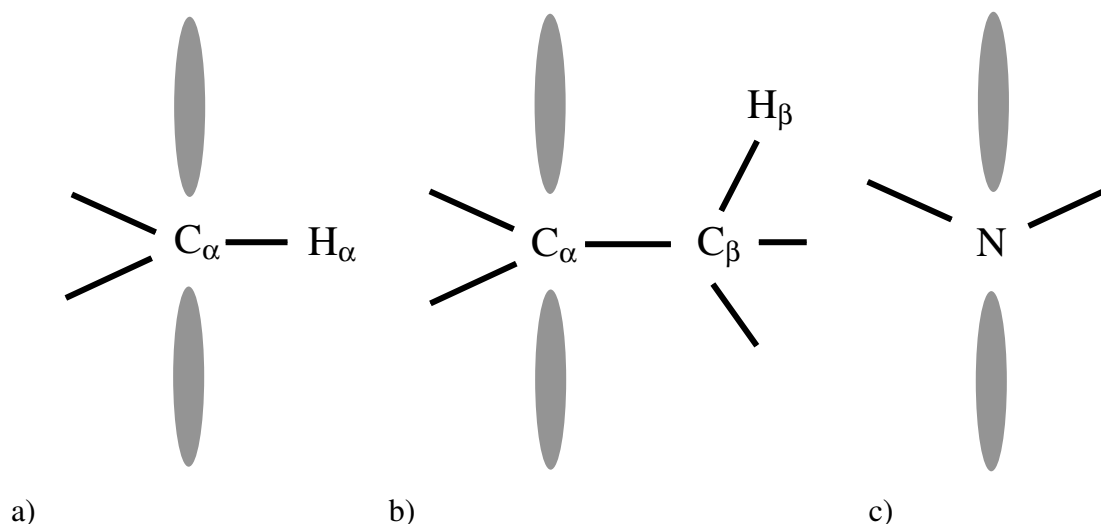
$$\mathcal{H}_{hf} = \mathbf{S} \cdot \hat{\mathbf{A}} \cdot \mathbf{I} \quad (2.18)$$

der matriseelementene $A_{ij} = a\delta_{ij} + A^0_{ij}$. A^0 er symmetrisk og traseløs, det betyr at trasen til $\hat{\mathbf{A}}$ er $3a$.

I et ESR/ENDOR enkrystall-eksperiment kan g-tensoren og hyperfinkoblingstensoren $\hat{\mathbf{A}}$ for de ulike vekselvirkningene bestemmes ved å gjøre målinger av splittingen a og tyngdepunktet g ved ulike orienteringer. Det antas at tensorene er symmetriske slik at de kan diagonaliseres for å finne deres prinsipalverdier og egenvektorer, som igjen er relatert til elektronfordeling og geometrisk struktur i molekylet. Dette kan gi verdifull informasjon om radikalstrukturen.

Koblingstyper

Vanlige koblingstyper for organiske radikaler er α -kobling, β -kobling og sentralkobling. Disse er vist i figur 2.2. Ved alle disse tre variantene antas det at det uparede elektronet er i et $2p_z$ -orbital, også kalt π -orbital. De ulike koblingstypene gir ulike hyperfinkoblings-tensorer med hensyn til forholdet mellom prinspalverdiene.



Figur 2.2: Forskjellige koblingstyper, a) α -kobling, b) β -kobling og c) sentralkobling. Sentralatomet antas i alle tilfellene å være sp^2 -hybridisert.

α -kobling

En vekselvirkning mellom et spinn i et $2p_z$ -orbital på et karbonatom og et hydrogenatom bundet direkte (i α -posisjon) til karbonatomet, gir opphav til en hyperfinkobling. Denne koblingen har et stort anisotrop dipol-dipol-bidrag med egenverdier ($a_d, 0, -a_d$). Den største positive egenverdien har egenvektor langs C-H-retningen, mens den intermediære egenverdiens egenvektor peker langs aksene til $2p_z$ -orbitalet. Det isotrope bidraget fra hyperfintensoren vil være negativt på grunn av induert negativ spinntetthet i hydrogenets $1s$ -orbital som følge av spin-exchange vekselvirkning. Isotropverdien a_{iso} er av størrelsesorden $-2a_d$ for karbonsentrerte α -koblinger slik at tensoren får prinspalverdier på formen $(-a_d, -2a_d, -3a_d)$. Et mål på spinntettheten ρ^π i karbonets $2p_z$ -orbital kan vi få fra a_{iso} ved McConnells relasjon (19):

$$a_{iso}^\alpha = Q_{CH}^H \rho^\pi \quad (2.19)$$

der Q_{CH}^H er en konstant som avhenger av ladning og geometri rundt α -karbonatomet (20).

β -kobling

Vekselvirkning mellom uparet spinn i et $2p_z$ -orbital plassert på et karbonatom og et hydrogenatom i β -posisjon, det vil si bundet til et karbonatom i naboposisjon til α -karbonatomet, utgjør en β -kobling. En β -hyperfintensor er nær aksialsymmetrisk. Dersom elektronet betraktes som en punktdipol, vil det anisotrope bidraget til β -tensoren ha egenverdier ($2a_d$, $-a_d$, $-a_d$). Her er størrelsen til a_d avhengig av avstanden \mathbf{r} mellom kjernen og det uparede spinnet:

$$a_d = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \beta_e g_N \beta_N \frac{\rho^\pi}{r^3} = 80 \frac{\rho^\pi}{r^3} \text{ [MHz]} \quad (2.20)$$

Det isotrope bidraget til β -tensoren er positivt, og avhenger av spinn tetthet og β -hydrogenets dihedralvinkel θ , gitt ved Heller-McConnell-relasjonen (21)

$$a_{\text{iso}}^\beta = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta) \rho^\pi \quad (2.21)$$

der B_0 og B_2 er konstanter med ulike verdier for ulike typer kjerner, bindingsavstander og konformasjoner (20). Dihedralvinkelen er vinkelen mellom planet utspent av C_α - C_β - H_β og planet utspent av C_α - C_β -retningen og p_z -retningen (se figur 2.2). β -tensorens maksimale egenverdi vil ha en egenvektor nær C_α - H_β -retningen.

Sentralkobling

En hyperfinkobling mellom et uparet elektron og spinn tetthet på den kjernen det er lokalisert til kalles en sentralkobling. Koblingstensoren avhenger her av elektron-orbitalene spinn er fordelt i. I dette tilfellet vil dipoltensoren A^0 være aksialsymmetrisk med prinsipalelementer ($2a_d$, $-a_d$, $-a_d$),

$$a_d = \frac{2}{5} g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{1}{r^3} \right\rangle \rho^\pi = a_d^0 \rho^\pi \quad (2.22)$$

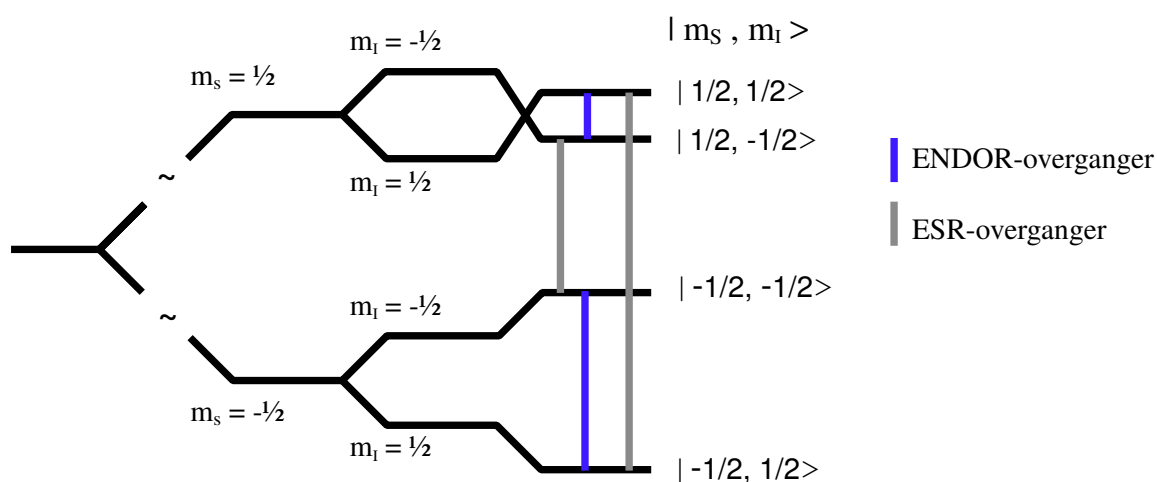
Vi ser at a_d avhenger av avstand, spinn tetthet (ρ^π) og kjernens egenskaper (g_N og β_N). For nitrogen er $a_d^0 \sim 49$ MHz. Det isotrope bidraget i koblingen er positivt, og oppstår på grunn av spinn polarisering mellom ulike orbitaler.

2.2 ENDOR - Electron Nuclear DOuble Resonance

ENDOR-spektroskopi innebærer at et radiofrekvent elektromagnetisk felt (rf-felt) er involvert i tillegg til det oppsettet som brukes for ESR. Magnetfeltet låses til én ESR-linje, for eksempel overgangen mellom $|m_s, m_I\rangle$ -kombinasjonene $|1/2, 1/2\rangle$ og $|1/2, -1/2\rangle$ som beskriver elektronflipp mellom α - og β -tilstand, med kjernen i α -tilstand (se figur 2.3). Denne overgangen vil, når magnetfeltet holdes konstant, mettes med mikrobølger slik at besetningsforskjellen mellom de to nivåene utjevnes og ESR-signalet opphører. Det pumpes deretter inn energi i form av radiofrekvente bølger som kan indusere overganger mellom kjernespin-nivåer. Dette feltet sveipes, og når frekvensen er tilpasset energiforskjellen, for eksempel mellom $|1/2, 1/2\rangle$ og $|1/2, -1/2\rangle$, vil også denne populasjonsforskjellen mettes. Dermed gjenoppstår en forskjell i populasjon mellom tilstandene $|1/2, 1/2\rangle$ og $|1/2, -1/2\rangle$. Henfall tilbake til likevekt mellom disse to tilstandene vil igjen gi opphav til en ESR-linje.

For et isotropt to-spinn-system av et elektron med egenspinn \mathbf{S} og en kerne med kjernespin \mathbf{I} har vi:

$$\langle \mathcal{H} \rangle = E_0 + g\beta B \langle S_z \rangle - g_N \beta_N B \langle I_z \rangle + a \langle S_z \rangle \langle I_z \rangle \quad (2.23)$$



Figur 2.3: Energidiagram og overganger. To-spinn-systemets tilstander betegnes ved m_s og m_I .

ENDOR-spekteret har i dette isotrope tilfellet to linjer, en lav- og en høyfrekvent, med resonansfrekvenser gitt ved

$$\nu_{\mp} = \left| \frac{1}{2} a \pm \nu_N \right| \quad (2.24)$$

der ν_N er friprotonfrekvensen gitt ved resonansbetingelsen for protoner ($h\nu_N = g_N\beta_N B$). For et anisotrop system er det hele mer komplekst, men ved å gjøre målinger av linjeposisjoner ved flere orienteringer kan man finne den tilhørende hyperfinkoblings-tensoren \hat{A} . På grunn av lengre relaksasjonstider for kjerner enn for elektroner, vil ENDOR-linjene ha en mindre linjebredde (være skarpere) og gi større presisjon i måling av hyperfinsplittingskonstanter enn ved bruk av ESR-linjer. I det foreliggende arbeidet er det benyttet ENDOR for eksperimenter med N-formylglysin. For cytosin:N-formylglysin var det ikke mulig å observere noe ENDOR-signal av betydning.

2.3 FSE - Field-Swept ENDOR

I Field-Swept ENDOR (FSE), også kalt ENDOR-Indusert ESR (EIE), låses det radiofrekvente feltet til en bestemt ENDOR-linje, dvs en bestemt m_I -overgang. Dermed mettes denne ved utjevning av populasjon i de to nivåene før magnetfeltet sveipes. Dette innebærer at også rf-frekvensen må varieres siden ENDOR-linjens resonansfrekvens (ligning 2.24) gjennom friprotonfrekvensen varierer med magnetfeltet ($\nu_N = g_N\beta_N B/h$). Når magnetfeltet har verdier som svarer til en ESR-overgang med felles energinivå som den m_I -overgangen som er mettet, vil det registreres en intensitetsforandring i ENDOR-linjen. FSE-spekteret ses på som et ESR absorpsjonsspekter som tilhører den observerte ENDOR-linjen. Et ESR-spekter består ofte av ulike radikaler som overlapper hverandre, det vil derfor være vanskelig å låse magnetfeltet til en m_S -overgang for et bestemt radikal. Linjene i ENDOR-spekteret vil dermed komme fra ulike radikaler. Ved å låse rf-frekvensen til bestemte ENDOR-resonansfrekvenser kan man observere FSE-spekteret til det gitte radikalet. ENDOR-linjer fra samme radikal vil på denne måten gi opphav til FSE-spektre med samme linjeposisjoner ettersom de har sin opprinnelse i samme ESR-spekter. I det foreliggende arbeidet er noen FSE-spektre tatt opp for N-formylglysin.

3 Metoder

3.1 Krystaller

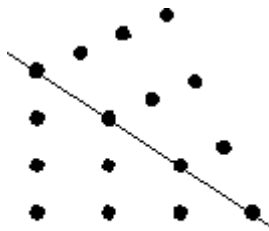
I det foreliggende arbeidet er det undersøkt to forbindelser i form av enkrystaller, aminosyrederivatet N-formylglysin, samt komplekskrystallen av dette sammen med DNA-basen cytosin, cytosin:N-formylglysin. Før disse kan undersøkes med ESR-spektroskopi må de framstilles fra de kommersielle pulverforbindelsene, bestråles og orienteres riktig langs ønsket rotasjonsakse.

Den minste enheten i en krystall som kan beskrive krystallens makroskopiske egenskaper kalles *enhetscellen*. Denne utspennes av aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$ som kalles enhetscelleakser eller krystallografiske akser. Vinklene mellom disse aksene kalles α (mellom $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$), β (mellom $\langle a \rangle$ og $\langle c \rangle$) og γ (mellom $\langle a \rangle$ og $\langle b \rangle$). I en ortorombisk krystall er alle disse vinklene 90° , mens i en monoklin krystall er vinkelen $\beta \neq 90^\circ$. Både ortorombiske og monokline enhetsceller har $|a| \neq |b| \neq |c|$. Det finnes ytterligere fem fundamentale typer av enhetsceller definert ved ulike kombinasjoner og forhold mellom a , b , c , α , β og γ . Krystallens *romgruppe* beskriver relasjonene mellom molekylene i enhetscellen gjennom innbyrdes symmetriegenskaper som rotasjon, refleksjon og translasjon. I hver enhetscelle finnes et visst antall asymmetriske enheter (molekyler) som generelt vil ha forskjellige orienteringer i forhold til det ytre magnetfeltet. På denne måten vil to molekyler som gir opphav til samme radikal ved de fleste orienteringer gi mer enn én resonans både i ESR og ENDOR. Dette fenomenet kalles *site-splitting*. I monokline krystaller vil det ved rotasjon om skrueraksen $\langle b \rangle$ ikke være site-splitting. Rotasjon om de andre aksene vil gi splitting ved alle orienteringer bortsett fra når magnetfeltet er rettet parallelt med en av enhetsaksene. Dette siste gjelder også for alle akserotasjoner av ortorombiske krystaller.

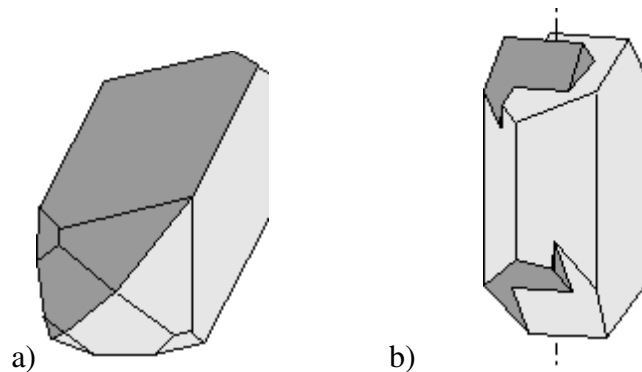
Twining

Twining kan oppstå spontant under krystallgroingen eller det kan skyldes deformasjon eller transformasjon etter endringer i trykk eller temperatur (22). Ved en perturbasjon under vokseprosessen adderes en ny krystall på overflaten av en allerede eksisterende

krystall. Twinning oppstår da hvis den nye krystallen deler gitterpunkter med den gamle, samtidig som de har ulik orientering. De felles gitterpunktene danner et speilplan (twinplan) slik som vist i figur 3.1. Et slikt plan deler tvillingkrystallene slik at den ene er et speilbilde av den andre. Planet er vanligvis parallelt med krystalloverflaten. Normalt på dette planet står en twin-akse som også er relatert til de krystallografiske aksene. Forholdet mellom de ulike delene av krystallen kan beskrives som en 180° rotasjon om twin-aksen. Det finnes to typer twin-krystaller: kontakt og penetrasjon, som vist i figur 3.2.



Figur 3.1: Twinning av krystall. Et speilplan dannes av sammenfallende gitterpunkter fra to krystaller. (22)



Figur 3.2: To eksempler på monokline krystaller med twinning ved a) kontakt og b) penetrasjon. (22)

3.2 Krystallorientering og røntgendiffraksjon

Enkrystallforsøk med ESR og ENDOR gjennomføres med krystallen i bestemte orienteringer i magnetfeltet. Krystallen roteres etter tur om tre akser, vanligvis de tre enhetscelleaksene. For å bestemme disse retningene i forhold til krystallens ytre morfologi, benyttes et Weissenberg røntgendiffraksjonskamera. Krystallen monteres på et goniometer og plasseres i en sylinderformet filmholder med sylinderakse parallelt med

goniometerets rotasjonsakse. Goniometeret oscillerer ca 10° i hver retning mens krystallen bestråles av en røntgenstråle rettet normalt på rotasjonsaksen. Røntgenstrålens refleksjoner i krystallgitteret gir et diffraksjonsbilde. Ved framkalling av film etter en slik prosess framkommer refleksjonene i parallelle rader dersom krystallaksen er parallell med rotasjonsaksen. Dersom disse refleksjonene ikke ligger på parallelle rader må det foretas en korreksjon av krystallens rotasjonsakse. Avstanden mellom (parallelle) rader av samme orden i forhold til senterlinjen sammenlignes med kalibreringskurver og ved dette finnes krystallaksens lengde. Denne lengden sammenlignes deretter med krystallografiske data for en endelig bestemmelse av aksens. Deretter kan krystallen overføres til en kvartsstav eller metallstav som også er rettet parallelt med rotasjonsaksen. Den totale feilmarginen etter rotasjonskorreksjoner og overføring er normalt av størrelsesorden 1° .

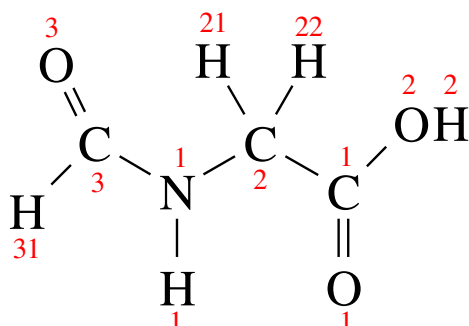
3.3 Røntgenbestråling

Røntgenbestråling av krystallene ble foretatt før montering for krystaller som skulle monteres på glasstav, mens krystaller som skulle monteres på metallstav ble bestrålt etter at de var montert. Alle bestrålingsprosessene ble gjennomført ved romtemperatur. Prøven var plassert på en metallboks, fylt med kaldt vann for avkjøling, ca 5 cm fra røntgenrørets sidevindu. Det ble benyttet et Phillips røntgenapparat med maksimalt 100 kV spenning. Begge krystalltypene ble bestrålt med 60 kV og 30/40 mA, noe som gir en doserate på ca 26-35 kGy/h. Cytosin:N-formylglysin måtte gis en betraktelig større dose enn N-formylglysin for å gi tilfredsstillende ESR-signaler. N-formylglysin ble bestrålt i om lag 1 time, kokrystallen opptil 3 timer. Etter bestrålingen hadde krystallene endret farge eller utseende i forhold til det blanke, gjennomsiktige utgangspunktet. Krystaller av N-formylglysin ble matte, mens kokrystallene ble lys orange/rosa.

3.4 N-formylglysin

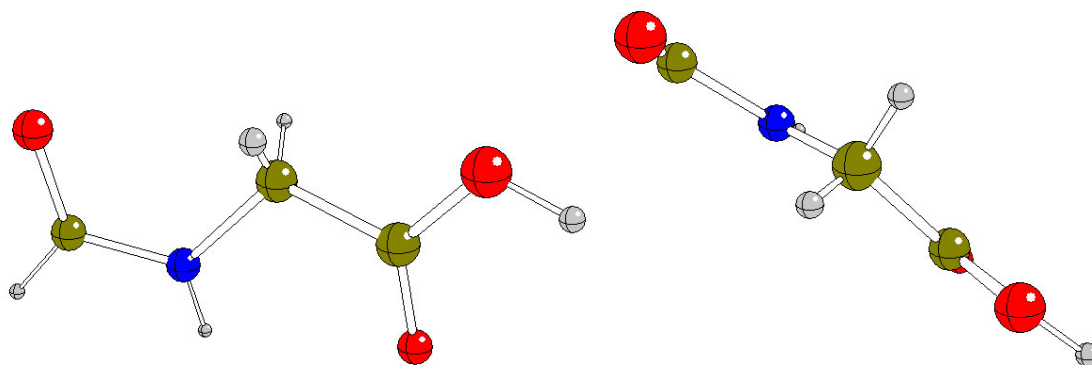
For å gro krystaller ble det benyttet N-formylglysin i pulverform levert fra Sigma og Fluka. Pulveret ble tilsatt vann, og en magnetrører ble benyttet for å løse opp pulveret i vannet. Etter at pulveret var oppløst, ble løsningen filtrert over på prøveglass og oppbevart ved romtemperatur. Etter noen dagers fordamping falt det ved ett tilfelle ut

forholdsvise store krystaller på bunnen av glasset. Disse hadde da en størrelse på opptil 2x2x2 mm. Det ble også prøvd lavere temperatur (med fordampning i kjøleskap) og høyere temperatur (med oppbevaring i varmeskap under fordampingen) uten særlig hell. Pulveret er svært lettløselig, ved romtemperatur løses 1g pulver i ca 4 ml vann.



Figur 3.3: Strukturformel, N-formylglysin

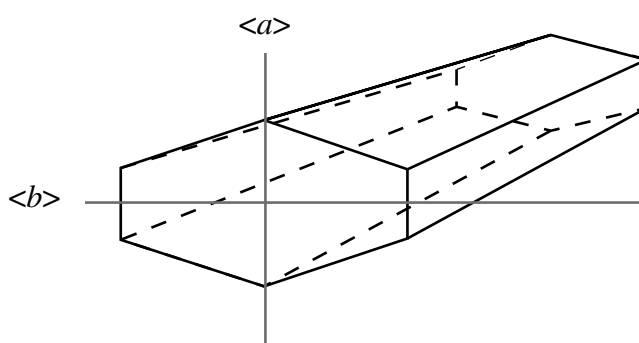
Strukturformelen er gitt i figur 3.3. Krystallstrukturen til N-formylglysin er ikke kjent i litteraturen. På forespørsel gjorde Carl Henrik Gørbitz (Kjemisk institutt, UiO) en røntgendiffraksjonsanalyse av krystallen og beskrev den komplette krystallografiske og molekylære struktur til N-formylglysin. De krystallografiske data for krystallen er gitt i appendiks C1. Krystallen er monoklin med romgruppe $P2_1/c$, som betyr at enkrystallen er primitiv og har en totallig skrueakse, $\langle b \rangle$, og $\langle ac \rangle$ som speilplan. Den monokline vinkel $\beta = 116.3^\circ$, og enhetsaksene $\langle a \rangle = 7.4378 \text{ \AA}$, $\langle b \rangle = 9.1650 \text{ \AA}$ og $\langle c \rangle = 7.1002 \text{ \AA}$. Det er fire molekyler i hver enhetscelle. Røntgendiffraksjonsstudiene viste at nålaksen tilsvarer $\langle a \rangle$. En uklar ytre morfologi gjorde det noe vanskelig å finne de andre aksene. Molekylene i krystallen er forbundet med hverandre via hydrogenbindinger. Disse forbinder O2 i et molekyl med N1 (via H1) i et nabomolekyl og via H2 til O3 i et annet nabomolekyl. Figur 3.4 viser at molekylet er nesten plant, bare H21 og H22 stikker ut av planet.



Figur 3.4: N-formylglysin-molekylet sett fra to ulike synsvinkler. Molekylet er nesten plant.

3.5 Cytosin:N-formylglysin

Ekvimolare mengder av cytosin levert fra Sigma og N-formylglysin levert fra Sigma og Fluka ble løst i vann på samme måte som N-formylglysin, men nå ved en temperatur på omkring 35 °C ved oppvarming på varmeplate. Filtrerte løsninger ble dekket med plast og oppbevart i varmeskap ved 35 °C. Etter noen dager ble temperaturen senket gradvis, 1-2 °C hver dag. Ved ett tilfelle oppstod det etter noen uker to klare krystaller på bunnen av et glass. Disse krystallene var ca 10 mm lange med en tykkelse på opptil 2 mm. En skisse av komplekskrystallens ytre morfologi er gitt i figur 3.5.

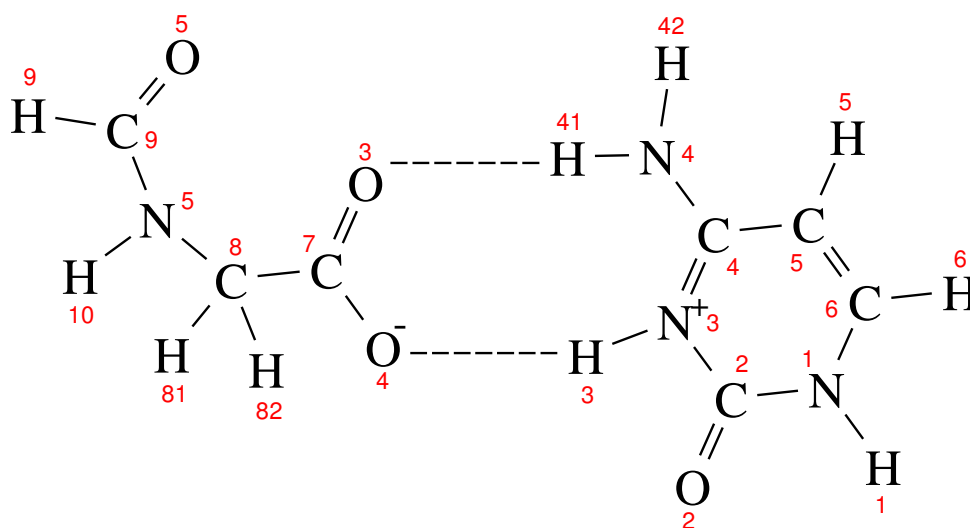


Figur 3.5: Cytosin:N-formylglysin, komplekskrystallens ytre morfologi. $\langle c \rangle$ ligger langs nålaksen.

Fordamping ved romtemperatur, med eller uten tildekking, resulterte i de aller fleste tilfeller i mange små nåler, 5 mm lange og opptil 1 mm i tverrsnitt. Disse nålene var oftest sammenvokst i endene. Slike krystallstørrelser var også resultatet etter de fleste forsøkene gjort ved fordamping i varmeskap. Forsøk med fordamping i kjøleskap var ikke vellykket, men metoden ble ikke særlig utprøvd fordi for lav temperatur førte til at løsningene frøs. Ved romtemperatur er det mulig å løse ca 1 g av hver av de to komponentene (ekvimolare mengder) i ca 60 ml vann. Cytosin har molvekt 111.1 g mens N-formylglysin er på 103.1 g. For begge komponentene vil derfor 1 g tilsvare ca 0.01 mol. Ved 35 °C løses samme stoffmengde i ca 35-40 ml. Strukturformelen er gitt i figur 3.6.

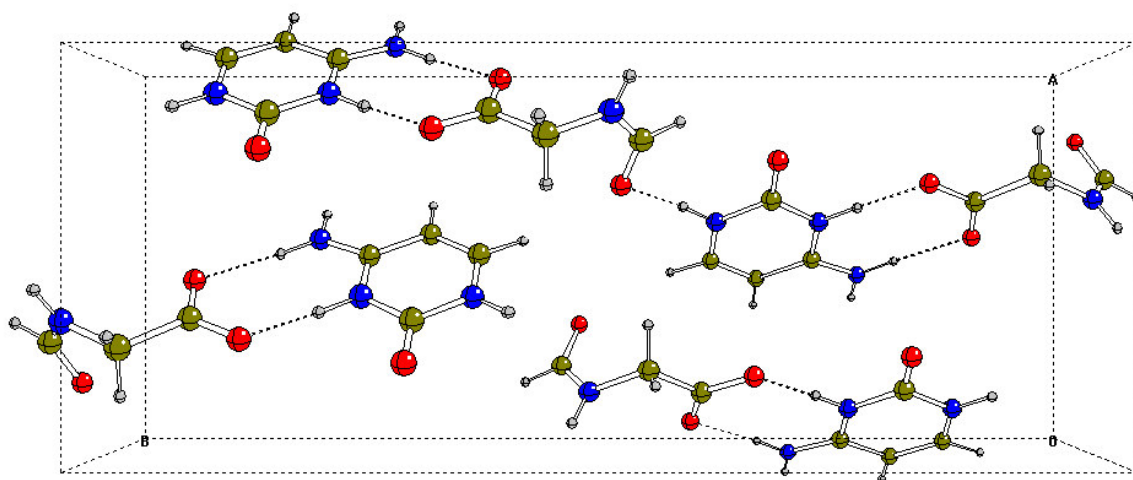
Krystallstrukturen til cytosin:N-formylglysin er beskrevet av Ohki *et al.* (23). Dette er en ortorombisk krystall med romgruppe $Pna2_1$ og enhetsakser $\langle a \rangle = 8.442 \text{ \AA}$, $\langle b \rangle = 21.169 \text{ \AA}$ og $\langle c \rangle = 5.120 \text{ \AA}$. De krystallografiske data for krystallen er gitt i appendiks C2. Alle aksene ble identifisert i våre diffraksjonsstudier, $\langle c \rangle$ er nålaksen. Det

er fire asymmetriske enheter i hver enhetscelle (se figur 3.7). Hver enhet består av ett N-formylglysin-molekyl og ett cytosin-molekyl (figur 3.6).



Figur 3.6: Strukturformel, cytosin:N-formylglysin

Komplekset er dannet av to hydrogenbindinger mellom oksygenatomene i den ioniserte karboksylgruppen i aminosyredelen og de to nitrogenatomene, N4 og det protonerte N3 i cytosin. N4---O3 har en avstand på 2.82 Å mens det mellom N3 og O4 er 2.63 Å. Positiv og negativ ladning er lokalisert til henholdsvis N3 og O4. Hydrogenbindinger finnes også mellom aminosyrens O5 og N1 i et annet cytosinmolekyl (vist i figur 3.7), mellom N4 og O2 i to forskjellige cytosinmolekyler og mellom O3 og N5 i to forskjellige aminosyre-molekyler.



Figur 3.7: Komplekstrystallens enhetscelle med fire asymmetriske enheter. Noen av hydrogenbindingene er vist.

3.6 ESR-eksperimentet

Et ESR-spektrometer gjør det mulig å indusere og detektere elektronspinn-overganger. En *elektromagnet* setter opp et relativt homogent magnetfelt over en *kavitet* (prøveholder). Magnetfeltet benyttet i disse eksperimentene ligger i overkant av 0.3 tesla, noe som ved resonans tilsvarer en mikrobølgefrequens rundt 9.5 GHz (X-bånd). En *mikrobølgegenerator* (klystron eller Gunn-diode) genererer mikrobølger som sendes videre til kaviteten gjennom metalliske bølgeledere med dimensjon (22.9 mm x 10.2 mm) som gir minimalt effekttap på veien. En *isolator* vil sørge for at mikrobølger som reflekteres i systemet ikke føres tilbake til og forstyrrer mikrobølgegeneratoren. Ved riktig frekvensinnstilling og impedanstilpasning, ved justering av irisåpningen mellom bølgeleder og kavitet, vil det oppstå stående bølger inne i kaviteten uten refleksjon av mikrobølger tilbake i bølgelederen. De stående bølgene er slik at midt i kaviteten, der krystallen befinner seg, er den elektriske feltkomponenten fra mikrobølgene $E_1 = 0$, samtidig som magnetfeltkomponenten B_1 har sin maksimale verdi. B_1 er rettet normalt på det ytre B-feltet fra elektromagneten. Av praktiske årsaker holdes mikrobølgefrequensen konstant mens det ytre magnetfeltet sveipes. B_1 oscillerer med frekvensen ω og kan forårsake spinnoverganger i prøven som er plassert i kaviteten. Prøven vil ved en eller flere magnetfeltverdier, gitt ved resonansbetingelsen, absorbere energi. Dermed oppstår det endrede resonansforhold inne i kaviteten, som ikke lenger vil oppfattes som en 'matched load', og det oppstår refleksjon av mikrobølger. Dette reflekterte absorpsjonssignalet ledes fra kaviteten via en *sirkulator* til *deteksjonssystemet*, hvor en diode registrerer spenningsvariasjoner. Diodesignalet omdannes til et 1. derivert ESR-absorpsjonsspekter ved hjelp av en datamaskin.

I et ENDOR-eksperiment holdes magnetfeltet konstant på en verdi som tilsvarer en ESR-absorpsjonslinje. Radiofrekvente bølger ledes via en forsterker inn i en liten spole som omgir prøven og setter opp et nytt magnetfelt normalt på det ytre feltet og normalt på B_1 . Sveiping av frekvensen til rf-feltet vil indusere kjernespinnoverganger når resonansbetingelsen for kjerner oppfylles.

I det foreliggende arbeidet er to spektrometre benyttet, et BRUKER ESP 300 E spektrometer i forbindelse med studier av N-formylglysin og et BRUKER ER 200 MRD spektrometer til undersøkelser av cytosin:N-formylglysin. En rektangulær ESR-kavitet og

en sylindrisk ENDOR-kavitet er benyttet. Krystallen ble rotert i magnetfeltet og spektre ble tatt opp for hver 5. eller 10. grad. De viktigste eksperimentene er gjennomført ved romtemperatur. Det ble ved noen anledninger benyttet flytende nitrogen for å avkjøle prøven for FSE og ENDOR, men slike eksperimenter har ikke gitt verdifulle resultater. I tabell 3.1 er det gitt en oversikt over de viktigste parametre som er benyttet i eksperimentene.

Tabell 3.1: Oversikt over de viktigste parametre benyttet i eksperimentene

ESR	N-formylglysin	Cytosin:N-formylglysin
Mikrobølgeeffekt (attenuering)	0.2-0.5 mW	0.5 mW
Modulasjonsbredde	0.16-0.18 mT	0.2 mT
Modulasjonsfrekvens	100 kHz /12.5 kHz	100 kHz
Sweeptid	41.9 s	65.5 s
Tidskonstant	164 ms	320 ms
Sweepbredde	10 mT	15 mT

ENDOR	N-formylglysin
Mikrobølgeeffekt	80 mW
Modulasjonsdybde	141.25 kHz
Modulasjonsfrekvens	12.5 kHz
Sweeptid	335.5 s
Tidskonstant	655 ms
Sweepbredde	20 MHz
rf-attenuering	10 dB

3.7 DFT - Density Functional Theory

Det er nyttig å dele opp den totale elektronenergien E til et system som

$$E = E_T + E_V + E_J + E_X + E_C \quad (3.1)$$

Dataprogrammer som finner løsninger av Schrödingerligningen beregner vanligvis disse delene uavhengig av hverandre. E_T er elektronenes kinetiske energi og E_V er elektronenes coulombenergi på grunn av kjerneattraksjon. Det tredje leddet er den coulombenergi elektronene ville hatt i sitt eget felt dersom de hadde beveget seg uavhengig (noe de ikke gjør) og hvis hvert elektron hadde frastøtet seg selv (noe det heller ikke gjør). For å korrigere for dette adderes de to siste leddene (24). I exchangeleddet E_X inngår korreksjonen for elektronenes selvrepulsjon, mens E_C inneholder korrelasjon mellom bevegelsen til elektroner med forskjellig spinn. E_X utgjør det meste av exchange-korrelasjonsenergien E_{XC} ($= E_X + E_C$) som igjen bare utgjør en liten del av den totale energien. E_V og E_J er felles for alle kvantekjemiske metoder. Det er uttrykkene som brukes for beregning av E_T , E_X og E_C som skiller de ulike SCF (Self Consistent Field) - metodene fra hverandre. I teorier som er basert på Hartree-Fock beregnes både E_T og E_{XC} fra orbitalene, som for eksempel

$$E_T = -\frac{1}{2} \sum_i^n \int \psi_i(\mathbf{r}) \nabla^2 \psi_i(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (3.2)$$

I DFT finnes både E_T og E_{XC} fra elektrontettheten ρ som i Ligning 3.4 (25).

Elektrontettheten ρ er en sum over spinn-opp (α) og spinn-ned (β) spinntettheter (24),

$$\rho(\mathbf{r}) = \rho_\alpha(\mathbf{r}) + \rho_\beta(\mathbf{r}) = \sum_{i \in \alpha} \psi_i^2(\mathbf{r}) + \sum_{i \in \beta} \psi_i^2(\mathbf{r}) \quad (3.3)$$

$$E_{XC}(\mathbf{r}) = \int f(\rho_\alpha(\mathbf{r}), \rho_\beta(\mathbf{r}), \nabla \rho_\alpha(\mathbf{r}), \nabla \rho_\beta(\mathbf{r})) d^3 \mathbf{r} \quad (3.4)$$

En *funksjonal* er definert i matematikken som en funksjon av en funksjon. I DFT er funksjonalene funksjoner av elektrontetthet - som igjen er en funksjon av romlige koordinater (som i ligning 3.4). Et større antall slike tetthetsfunksjonaler er definert, forskjellen består i hvordan de behandler exchange- og korrelasjons-komponentene. Utfordringen i DFT er å konstruere funksjonaler som beskriver E_T og E_{XC} mest mulig nøyaktig for atomer og molekylære systemer. *Gradientkorrigerte* funksjonaler involverer både elektronspinn tettheten ρ og dens gradient, $\nabla \rho$. Slike funksjonaler er også kalt ikke-lokale, i motsetning til *lokale* funksjonaler som bare involverer elektronspinn tetthet (25). En mye benyttet gradientkorrigert exchange-funksjonal ble foreslått av Becke i 1988 (26)

og en mye brukt korrelasjonsfunksjonal er LYP, etter Lee, Yang og Parr (27).

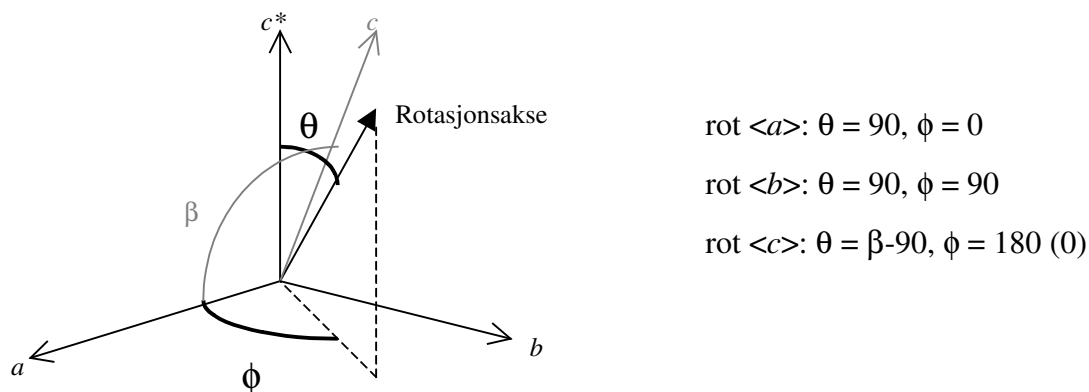
Kombinasjonen av disse to danner B-LYP metoden. Det finnes også flere hybridfunksjonaler som definerer exchangefunksjonalen som en lineærkombinasjon av Hartree-Fock, lokal- og gradientkorrigerede exchangetermer. Denne exchangefunksjonalen kombineres deretter med en lokal og/eller gradientkorrigert korrelasjonsfunksjonal. Den mest kjente av disse hybridfunksjonalene er Beckes tre-parameter funksjonal (28). B3LYP er basert på denne og er brukt i alle beregningene i det foreliggende arbeidet.

Et *basis-sett* er en matematisk presentasjon av molekylorbitaler og kan tolkes som en romlig begrensning for hvert elektron. Store basis-sett gir færre begrensninger på elektroner og vil mer presist approksimere eksakte molekylære orbitaler. To typer funksjoner brukes for å konstruere basis-sett, Slater-type orbitaler (STO) og Gauss-type orbitaler (GTO). STO er mer eksakte, men mer kompliserte og tidkrevende å bruke enn GTO. Ved å ta utgangspunkt i et STO og deretter addere flere GTO fås en akseptabel approksimasjon til bølgefunksjonen. Et eksempel på et basis-sett er 6-311G. Her vil 6 GTO beskrive s-orbitalet, 3 GTO vil beskrive et sp-orbital og 1 GTO gir beskrivelser av hver av de to siste sp-orbitalene. For ladde eller eksiterte molekyler anbefales i tillegg bruk av diffuse funksjoner. Et eksempel på dette er basis-settet 6-311+G(2df,p). Her er et 6-311 basis-sett supplert med to d-funksjoner og en f-funksjon for tunge atomer samt en p-funksjon for hydrogenatomer (29).

I det foreliggende arbeidet er DFT, som implementert i programsystemet *Gaussian 98* (30), benyttet til å beregne optimale strukturer/geometrier for ulike radikalkandidater. For slike tunge optimaliseringer ble det benyttet en relativt enkel basis, 6-31+G(d). Med en mer eksakt tilnærming 6-311+G(2df,p) ble størrelsen til alle isotrope og anisotrope hyperfinkoblingskonstanter beregnet. Denne basisen gir generelt den beste beskrivelsen av hyperfinstruktur i molekyler (31). Disse resultatene kunne i sin tur sammenlignes med de eksperimentelle resultatene og på denne måten bistå i tolkningen av eksperimentelle data. Hver DFT-beregning ble gjort for et isolert molekyl, slik at vekselvirkninger mellom nabomolekyler ikke ble tatt hensyn til. Resultatene kunne dermed ikke bli helt korrekte, men kan gi en indikasjon på koblingenes størrelser. Et eksempel på en input-fil er gitt i appendiks A.

3.8 Andre programmer

En rekke spesielle dataprogrammer benyttes i forbindelse med behandling og analyse av innsamlede data og i forbindelse med simuleringer. Her gis en kort beskrivelse av de mest aktuelle. Alle programmene er tilgjengelige ved ESR-laboratoriet, Fysisk institutt, UiO. *Winepr* (32) gir muligheter for post-prosessering av innsamlede absorpsjonsspektre før videre beregninger. *Esrlib* er en samling nyttige subrutiner for ulike beregninger av enkrystallers molekylære egenskaper (33). Programmet *magres* beregner koblingstensorer med prinsipalverdier og tilhørende egenvektorer ved hjelp av n-dimensjonal tilpasning til de eksperimentelle data (34, 35). *Magcalc* er en invers variant av *magres* som kan generere linjeposisjoner ut fra prinsipalverdier og krystallorientering gitt ved vinklene θ og ϕ som beskrevet i figur 3.8.



Figur 3.8: Angivelse av vinklene θ og ϕ som relaterer rotasjonsaksen til krystallens enhetsakser.

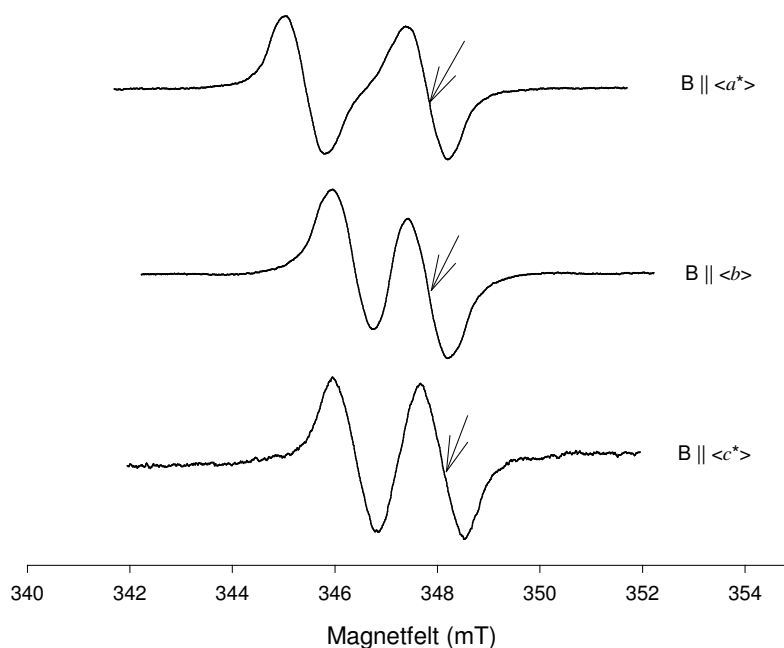
Programmet *dipol* beregner det dipolare bidraget i en koblingstensor fra et X^{\bullet} -Y-H-fragment ved hjelp av bindingsavstander, vinkler og spinn tettheter (36).

Simuleringsprogrammet *kvasat* ble benyttet i forbindelse med simulering av ESR-spektre (37, 38). Programmet kan beregne ESR-spektre ut fra blant annet prinsipalverdier og egenvektorer for aktuelle radikaler. I det foreliggende arbeidet er også semi-empiriske molekylorbital-beregninger av typen INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap) (39) benyttet for beregning av spinn tettheter. I semi-empirisk MO-teori beregnes energi ved å betrakte vekselvirkningen for hvert elektron med totalfeltet fra de andre elektronene. *Indo*-programmet utfører en såkalt restricted Hartree-Fock SCF beregning med approksimasjonsnivå INDO for blant annet å finne spinn tetthet i atomorbitalene (40). *Moldraw* (41) er benyttet til visualisering av molekyler.

4 N-formylglysin

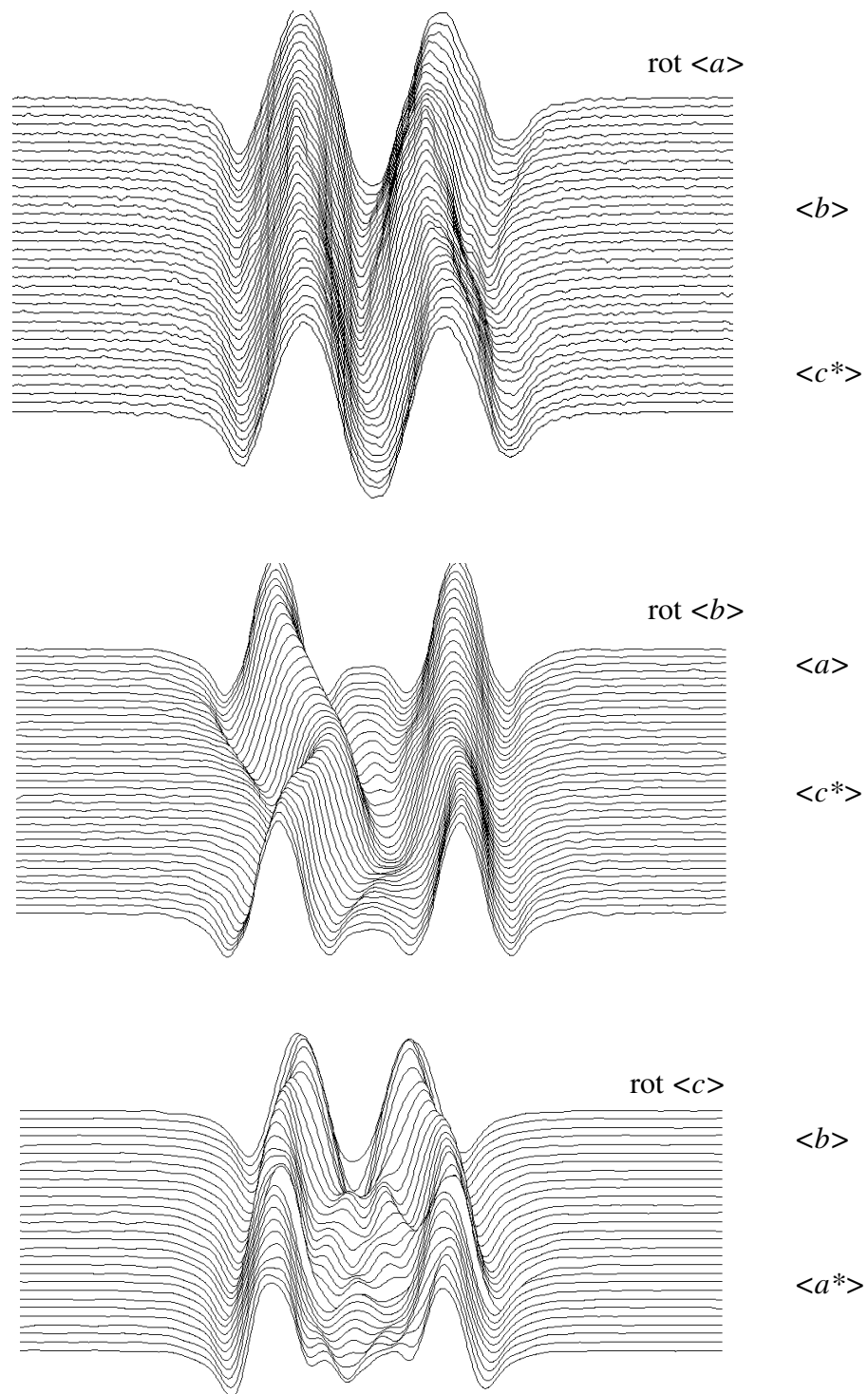
4.1 ESR-resultater

Krystaller av N-formylglysin ble røntgenbestrålt ved romtemperatur i 45-60 minutter, noe som tilsvarer en dose på 20-26 kGy. ESR-spektre med sweepbredde 10 mT ble deretter tatt opp ved hver 5. grad ved opptil 180 graders rotasjon om de tre krystallografiske aksene. Figur 4.1 viser førstederiverte ESR-spektre som er tatt opp med magnetfeltet rettet langs aksene $\langle a^* \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c^* \rangle$.



Figur 4.1: Førstederiverte ESR-spektre av enkeltkrystaller av N-formylglysin bestrålt og målt ved romtemperatur. Spektrene er tatt opp med magnetfeltet parallelt med de angitte akser. Pilene markerer linjene som representerer spinovergangene som mettes under ENDOR-eksperimentene. Mikrobølgefrekvensen er her justert til 9.73709 GHz for alle spektrene.

Aksespektrene utgjøres av en bred dublett-struktur. Monokline krystaller viser vanligvis site-splitting for rotasjon om $\langle a \rangle$ og $\langle c \rangle$. I disse ESR-studiene av monokline krystaller av N-formylglysin er denne splittingen ikke observerbar, trolig på grunn av den relativt store linjebredden. Dublettstrukturen i de tre 1. deriverte ESR-aksespektrene gir likevel noe informasjon. Spektre tatt opp ved rotasjon om $\langle c \rangle$ viser noe mer struktur, men etter integrasjon for å studere absorpsjonsspektre skiller ikke rot $\langle c \rangle$ -spektrene seg vesentlig fra andre rotasjonsplan (alle viser to topper som i figur 4.11). Likevel antyder spektrene fra rotasjon om $\langle c \rangle$ at resonansen består av noe mer enn en enkelt proton-kobling.



Figur 4.2: Andrederiverte ESR-spektre av enkrystaller av *N*-formylglysin bestrålt og målt ved romtemperatur. Spektrene er tatt opp ved rotasjon om henholdsvis $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$ med 5 graders intervall.

Figur 4.2 viser ESR-spektre i tre plan. Dublettkoblingen er karakteristisk for en α -type kobling, med stor variasjon i oppsplittingen (anisotropi). I den følgende spekteranalysen er linjeposisjoner fra ESR-spektrene benyttet i beregningen av g -tensor. Også hyperfintensoren til α -koblingen kan estimeres på bakgrunn av ESR-data, men store linjebredder medfører en mye større usikkerhet enn ved beregning fra eventuelle ENDOR-data. Stor linjebredde kan skyldes uoppløste koblinger som N-H, N og andre mindre koblinger. Twinning (kapittel 3.1) vil også kunne påvirke linjebredden.

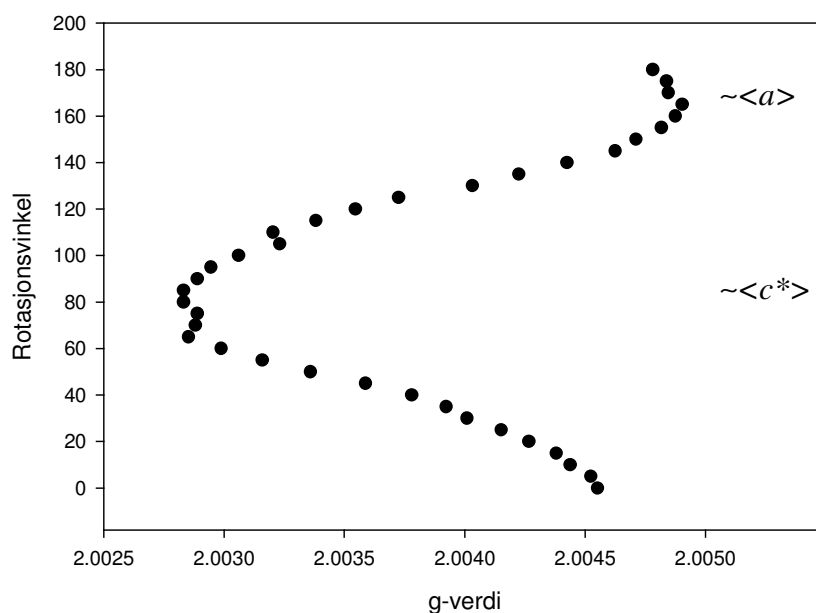
g-tensor

Beregning av g -tensor er gjort ved å ta utgangspunkt i formelen $g = 2h\nu/\beta_e(B_1+B_2)$, der B_1 og B_2 er magnetfeltposisjonen til de to linjene i ESR-spektrene. Med denne formelen beregnes tyngdepunktet (g -verdien) for hver krystallorientering. Deretter beregnes g -tensoren ved bruk av *magres*.

Tabell 4.1: g -tensor for radikalet dannet i bestrålt *N*-formylglysin ved romtemperatur. Verdiene er forbundet med svært store usikkerheter. For prinspalverdier er usikkerheten i de siste sifrene angitt. For egenvektorene er usikkerheten så stor (i alle sifre) at bare hovedtrekkene i retningene er gitt.

	Prinspal- verdier (MHz)	Egenvektorer		
		$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c^* \rangle$
g	2.005 (12)	1	0	0
	2.004 (12)	0	1	0
	2.003 (10)	0	0	-1

Tabell 4.1 viser den beregnede g -tensoren. Tensorens anisotropi er relativt liten, men likevel noe større enn for rene karbonsentrerte radikaler. De beregnede egenvektorene er beheftet med svært store usikkerheter, men viser tydelige tegn til å være rettet nær de krystallografiske aksene, med maksimalverdi nær $\langle a \rangle$ og minimalverdi nær $\langle c^* \rangle$. Til tross for de store usikkerhetene viser dette seg å være i overensstemmelse med figur 4.3. Der er g -verdien hentet fra rotasjon om $\langle b \rangle$, og viser seg å være noe større i området nær $\langle a \rangle$ enn nær $\langle c^* \rangle$. For rotasjon om $\langle b \rangle$ skal det ikke være site-splitting, og dermed *burde* dette representere et bedre utgangspunkt (enn de andre rotasjonsplanene) for beregning av g -verdier. Betydelig usikkerhet på grunn av manglende oppløsning av site-splittingen i ESR-spektre for rotasjon om $\langle a \rangle$ og $\langle c \rangle$ og problemer med twinning (jf ENDOR-resultatene, kapittel 4.2) medfører at g -tensorens prinspalverdier og retninger ikke uten videre kan tillegges særlig vekt.



Figur 4.3: g-verdier ved rotasjon om $\langle b \rangle$ for enkrystaller av N-formylglysin, bestrålt og målt ved romtemperatur.

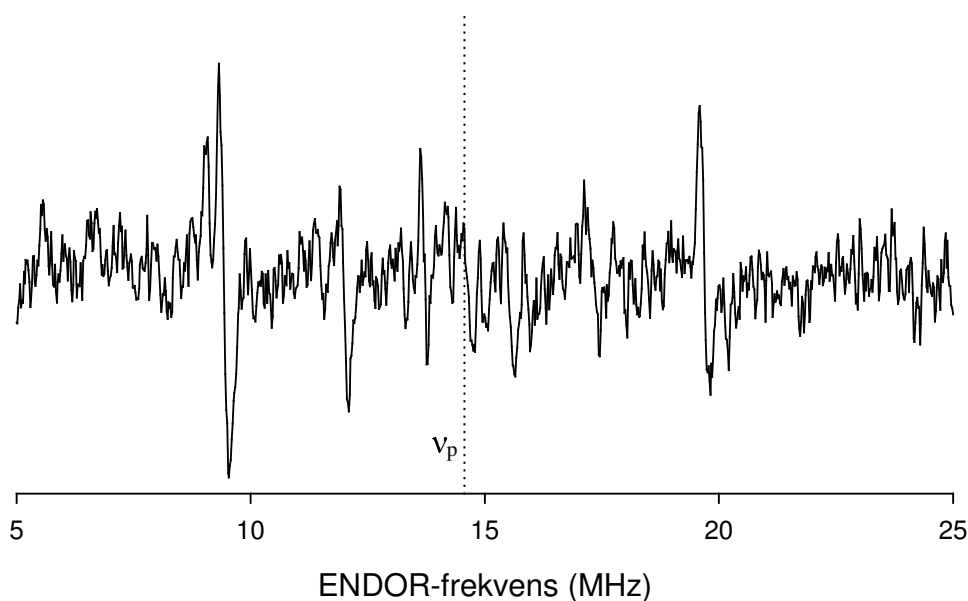
Fra ESR-data ble det gjort en tentativ beregning av hyperfinkoblingstensen for den store dubletten (tabell 4.2). Isotropverdien ble beregnet til -54.1 MHz, med prinsipalretningene nær enhetsaksene. Som for g-tensoren er det store usikkerheter på grunn av de store linjebredden og uopløst site-splitting. Det er likevel et samsvar mellom de to tensorene ettersom både intermediærretningen til hyperfinkoblingen og minimalretningen til g-tensoren er parallelle med $\langle c^* \rangle$. Eventuelle beregninger ut fra ENDOR-data vil kunne gi en bedre beskrivelse av denne koblingen.

Tabell 4.2: Hyperfinkoblingstensor for et radikal observert i bestrålt N-formylglysin. Prinsipalverdier og retninger er beregnet ut fra ESR-data. Tallene i parentes angir usikkerheten i de siste sifrene.

Prinsipalverdier (MHz)	Isotrop verdi (MHz)	Egenvektorer		
		$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c^* \rangle$
-74.5 (6)		.996 (002)	.090 (025)	-.012 (022)
-46.9 (6)	-54.1 (1.2)	.013 (022)	-.015 (108)	.999 (003)
-40.9 (7)		.090 (023)	-.996 (003)	-.016 (108)

4.2 ENDOR-resultater

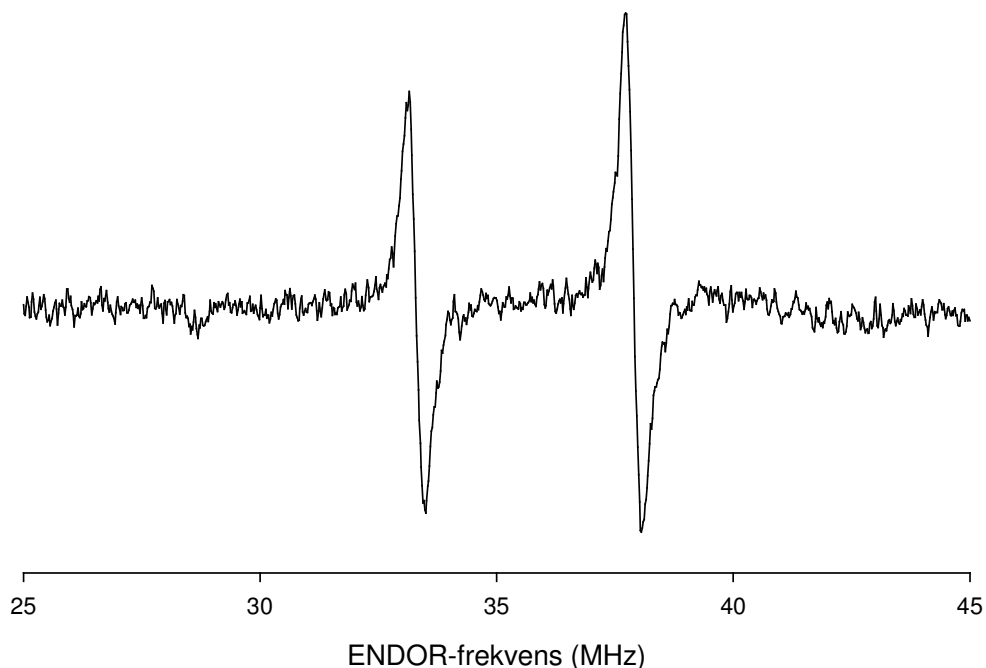
For å få bedre oppløsning og for å få mer informasjon om det radikalet som ses i ESR-spektrene, ble det også gjort ENDOR-undersøkelser av de bestrålte krystallene. Magnetfeltet ble låst til ESR-linjen som er markert med piler i figur 4.1. ENDOR-spektre ble tatt opp for hver 5. eller 10. grad, ved rotasjon om de tre krystallografiske aksene i forbindelse med opptak av ESR-spektre. For å kunne hente ut mest mulig informasjon ble det benyttet to forskjellige frekvensintervaller, et lavfrekvent område omkring 5-25 MHz og et høyfrekvent område omkring 25-50 MHz. I det lavfrekvente området er det svært vanskelig å følge linjer over større områder eller i flere plan ettersom signal/støy-forholdet er relativt dårlig, som vist i figur 4.4. En hyperfinkobling med høyfrekvent gren rundt 20 MHz er imidlertid fulgt i alle tre plan. Ved rotasjon om $\langle a \rangle$ er også den tilhørende lavfrekvente grenen omkring 9.5 MHz observert. Den tilhørende hyperfintensoren (tensor 2) for den høyfrekvente grenene ble beregnet og er gitt i tabell 4.3.



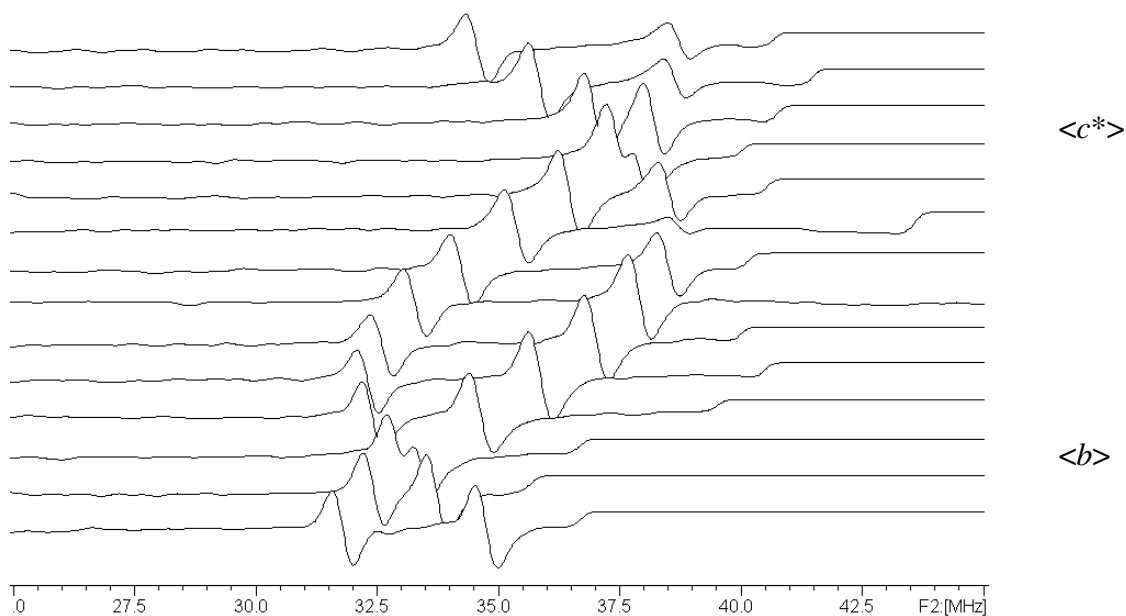
Figur 4.4: Eksempel på lavfrekvent ENDOR-spekter (1.derivert) av bestrålt *N*-formylglysin rotert om $\langle a \rangle$, orientering midt mellom to akser. Fri-proton-frekvensen ν_p er markert (14.65 MHz).

I det høyfrekvente området (25-50 MHz) observeres det kun en høyfrekvent gren av en α -type kobling. Denne er, som vist i figur 4.5, splittet i to som følge av site-splitting ved alle orienteringer bortsett fra parallelt med aksene. Figur 4.6 viser ENDOR-spektre som funksjon av vinkel ved krystallrotasjon om $\langle a \rangle$. Signal/støy-forholdet er bra og linjene

kan følges i alle tre rotasjonsplan. Det har ikke vært mulig å følge den lavfrekvente grenen av denne koblingen.

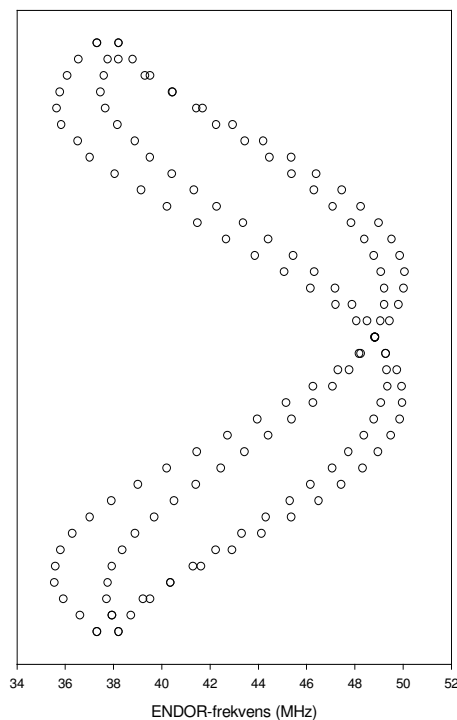


Figur 4.5: Førstederivert ENDOR-spekter av enkrystall av *N*-formylglysin bestrålt og målt ved romtemperatur. Spekteret er tatt opp ved rotasjon om $\langle a \rangle$, orienteringen er midt mellom to akser. Figuren viser den høy-frekvente delen av en α -type kobling, linjen er splittet i to som følge av site-splitting. Koblingens angulære variasjon ses i figur 4.6 og figur 4.9.



Figur 4.6: Førstederiverte ENDOR-spektre av *N*-formylglysin, bestrålt og målt ved romtemperatur. Spektrene er tatt opp ved rotasjon om $\langle a \rangle$ og viser den høyfrekvente delen av en hyperfinkobling, splittet i to på grunn av site-splitting.

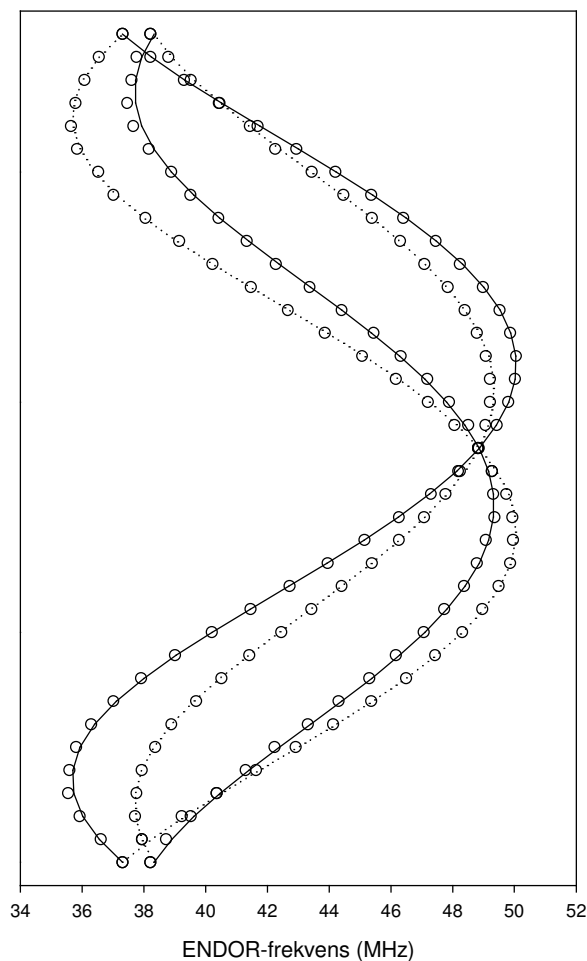
En monoklin krystall som *N*-formylglysin forventes i utgangspunktet å vise site-splitting siden molekylene i enhetscellen har to magnetisk ikke-ekvivalente orienteringer. For rotasjon om skrueraksen $\langle b \rangle$ vil imidlertid alle enhetscellens molekyler ha samme retning i forhold til magnetfeltet og site-splittingen opphører. Linjeposisjoner fra ENDOR-eksperimentet med *N*-formylglysin ved rotasjon om $\langle b \rangle$ er vist i figur 4.7.



Figur 4.7: Linjeposisjoner fra ENDOR-spektre av bestrålte enkrystaller av *N*-formylglysin. Avlest frekvens for ENDOR-linjene er plottet inn for hver krystallorientering ved rotasjon om $\langle b \rangle$.

Resultatet var ikke én linje som forventet. Hele fire linjer med et symmetrisk oppførsel kunne følges i området 34-52 MHz. De fire linjene hadde intensitet av samme størrelsesorden. Feilorientering vil gi opphav til to linjer i stedet for en linje, men det er fortsatt dobbelt så mange linjer som det skulle være. En foreløpig tensorberegning med *magres* ut fra data i flere plan ga et forslag til prinsipalverdier og verdien av vinklene θ og ϕ (se figur 3.8). Med dette som utgangspunkt ble deretter *magcalc* benyttet for å beregne teoretiske kurver for ulike tensorer med ulike valg av θ og ϕ . Kombinasjonen 90 / 90, det vil si rotasjon om $\langle b \rangle$ uten feilorientering, gav kun én linje som forventet for rotasjon om skrueraksen (90 / 90 her er ekvivalent med 90 / -90). Alle andre kombinasjoner av θ og ϕ gav opphav til to linjer. For tilfellet $\theta = 90$ ville ikke disse to korresponderende linjene krysse hverandre for noen ϕ . Det måtte derfor være $\theta \neq 90$. For at linjene skulle være sammenfallende i $\langle a \rangle$, som de er eksperimentelt, må ϕ være 90. Det viste seg at en

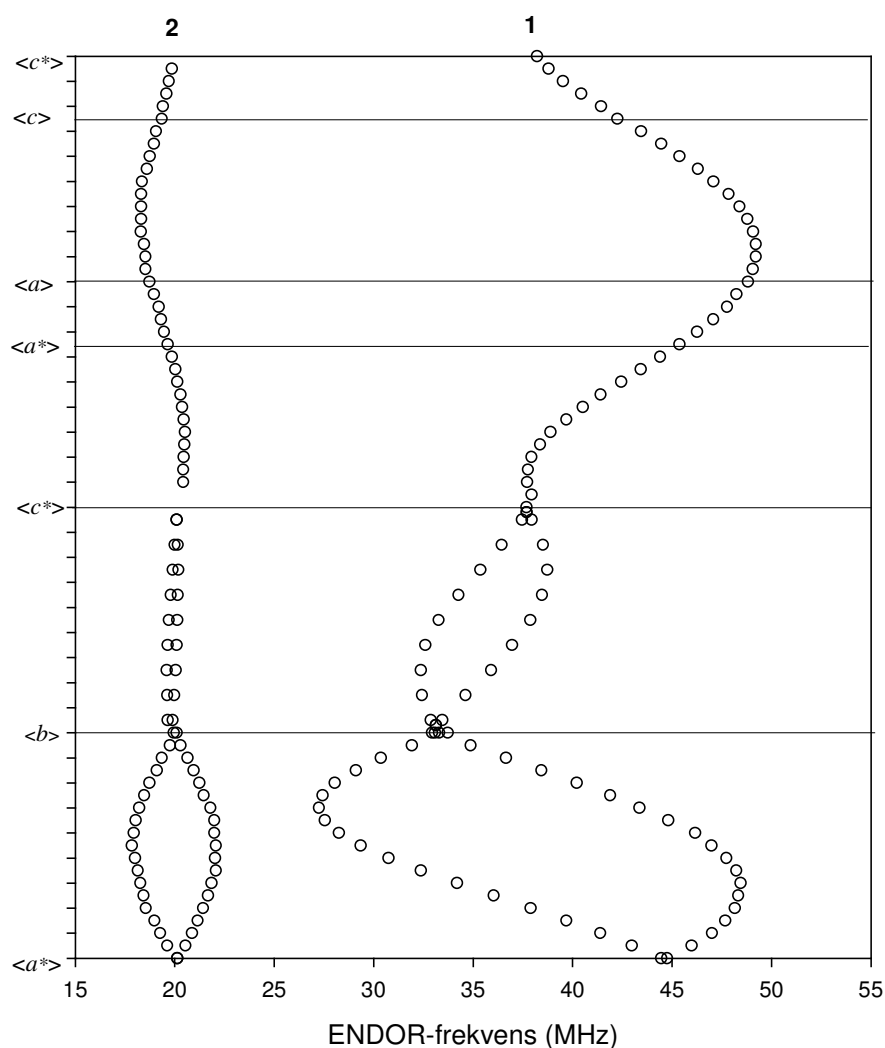
kombinasjon av vinklene θ / ϕ på $83.5 / \pm 90$ gir den ene halvparten av det eksperimentelle resultatet. Den andre halvparten, det vil si de to siste linjene, viste seg etter symmetribetrakninger å falle på plass ved i tillegg å bruke vinkelkombinasjonen $(83.5 + 180 / \pm 90)$. De avleste linjeposisjonene er i figur 4.8 plottet sammen med de teoretisk beregnede verdiene fra *magcalc*.



Figur 4.8: Bestrålt *N*-formylglysin, ENDOR-eksperiment. Sirkler viser linjeposisjonene funnet eksperimentelt ved rotasjon om $\langle b \rangle$. Heltrukne linjer er beregnet med *magcalc* utfra vinkelkombinasjonen $83.5 / \pm 90$. Stiplede linjer er beregnet med $263.5 / \pm 90$.

Et så bra samsvar mellom teoretisk antatte verdier og eksperimentelle verdier indikerer at hyperfinkoblingstensen beregnet ved hjelp av *magres* stemmer med virkeligheten. I tillegg viser dette at krystallen gir et dobbelt sett med resultater, hvor linjene fra de to settene ser ut til å skyldes rotasjon i motsatte retninger fra aksene. Krystallen er trolig ikke en ren en-krystall, men ser ut til å være utsatt for twinning (kapittel 3.1) i groprosessen. Forholdet mellom de ulike delene av krystallen kan trolig beskrives som en 180° rotasjon om en twinakse. Ved korrekt orientering skal θ være 90° ved rotasjon om

$\langle b \rangle$. Figur 3.8 viser at en rotasjon om $\langle -b \rangle$ er gitt ved $\theta = 270^\circ$ (-90°). De relativt like linjeintensitetene kan tyde på at nærmere halve krystallen er rotert på denne måten. Det er tendenser til slike doble signaler også i spektre fra en annen krystall tatt opp ved rotasjon om $\langle c \rangle$, men der er trolig andelen twinning noe lavere. Som et resultat av dette ble kun én av linjene fra rotasjon om $\langle b \rangle$ benyttet i tensorberegningene. Den høyfrekvente delen av α -koblingen som opptrer i alle rotasjonsplanene er vist i figur 4.9 (tensor 1). Også hyperfinkoblingen med høyfrekvent gren omkring 20 MHz (tensor 2) viser fenomenet med fire linjer i stedet for én linje ved rotasjon om $\langle b \rangle$. Derfor er kun én av disse linjene benyttet ved beregning av tensor 2. Tabell 4.3 viser de to hyperfinkoblingstensorene. Tensorene er beregnet ut fra de eksperimentelle data ved hjelp av analyseprogrammet *magres*.



Figur 4.9: Angular variasjon i rotasjonsplan av ENDOR-linjer fra radikal observert i *N*-formylglysin, bestrålt og målt ved romtemperatur. Symbolene markerer eksperimentelle verdier. Tallene (1 og 2) refererer til koblingene i tabell 4.3.

Tabell 4.3: Hyperfinkoblingstensorer og tilhørende egenvektorer funnet i N-formylglysin, bestrålt og målt ved romtemperatur. Beregninger er gjort ved hjelp av *magres*. Tallene i parentes angir usikkerheten i de siste sifrene.

Tensor	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Prinsipal-verdier (MHz)	Egenvektorer		
				$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c^* \rangle$
1	-48.33 (7)	-24.06 (8)	-72.39 (3)	0.9070 (1)	-0.3905 (7)	-0.1578 (2)
		0.11 (7)	-48.21 (2)	0.0115 (4)	-0.3517 (7)	0.9361 (2)
		23.95 (8)	-24.37 (3)	0.4210 (7)	0.8508 (3)	0.3145 (7)
2	-9.99 (5)	-4.50 (6)	-14.50 (2)	0.6779 (5)	-0.6860 (42)	0.2641 (6)
		-1.21 (6)	-11.21 (2)	0.0343 (19)	0.3885 (44)	0.9208 (9)
		5.72 (6)	-4.27 (2)	0.7343 (57)	0.6152 (18)	-0.2869 (22)

Krystallografiske (og andre) retninger for N-formylglysin (atomnummerering se figur 4.12 og kap. 4.4):

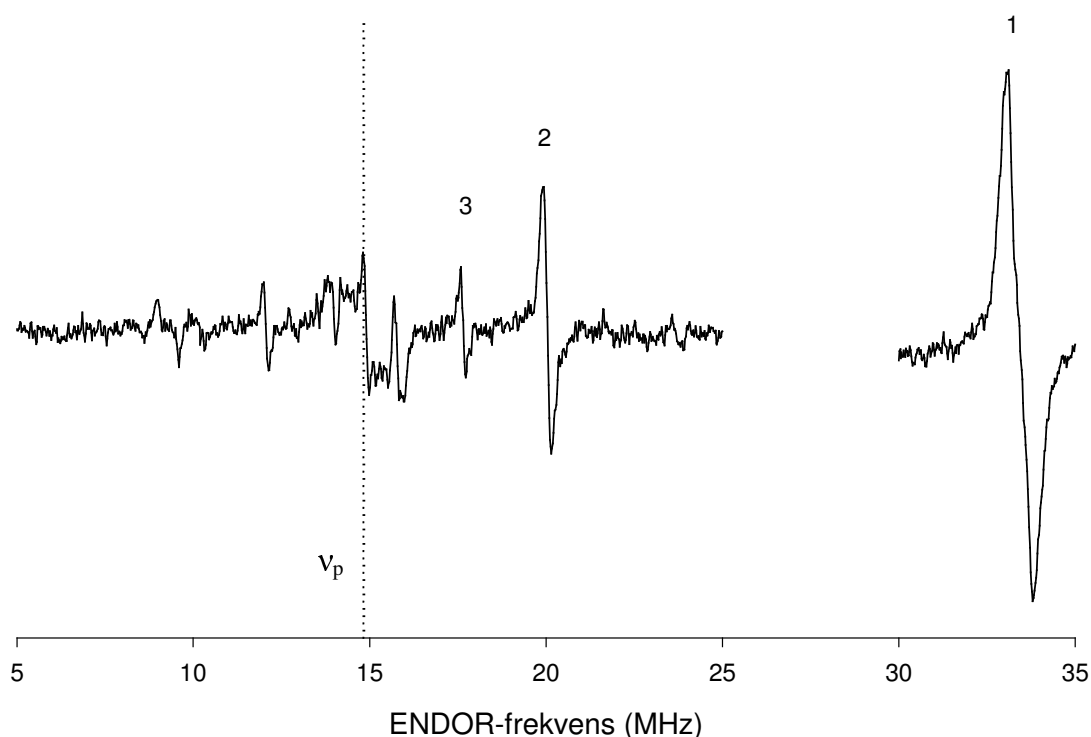
Normal til planet C1-C2-N1	-0.0605	-0.5907	0.8046
Normal til planet O3-C3-H31	0.0673	-0.4772	0.8762
N1-H1	-0.3930	-0.8555	-0.3373
C2-H21	-0.2700	-0.9195	0.2856
C2-H22	-0.1022	0.0663	-0.9925
C2-H2x	0.3059	0.7563	0.5782
C2---H1	0.2742	-0.8434	-0.4620
C3---H1	-0.8636	-0.4830	-0.1442
C3-H31	0.5258	-0.7294	-0.4376

Den største hyperfinkoblingen (tensor 1) har form som en typisk C-H α -kobling med anisotrope bidrag nær $(a_d, 0, -a_d)$ og a_{iso} lik $2a_d$. Ved hjelp av den beregnede isotropverdien er det mulig å anslå spinntettheten. Ved McConnells relasjon (19), $a_{\text{iso}} = Q_{\text{C-H}} \rho^\pi$, kan man finne spinntetthet på karbonatomet ut fra den isotrope koblingskonstanten. Verdien til $Q_{\text{C-H}}$ er fra -2.3 mT til -2.9 mT. For nøytrale molekyler benyttes -2.6 mT som tilsvarer -72.8 MHz (20). Med $a_{\text{iso}} = -48.3$ MHz blir spinntettheten 0.66. I følge Bernhard (42) gir a_d en mer pålitelig verdi for spinntetthet på α -karbonatomer via relasjonen $a_d = Q_{\text{dip}} \rho^\pi$, der Q_{dip} er empirisk valgt til 38.7 MHz for den mest positive a_d . Med 24.0 MHz som den mest positive dipolare koblingsverdien blir spinntettheten 0.62.

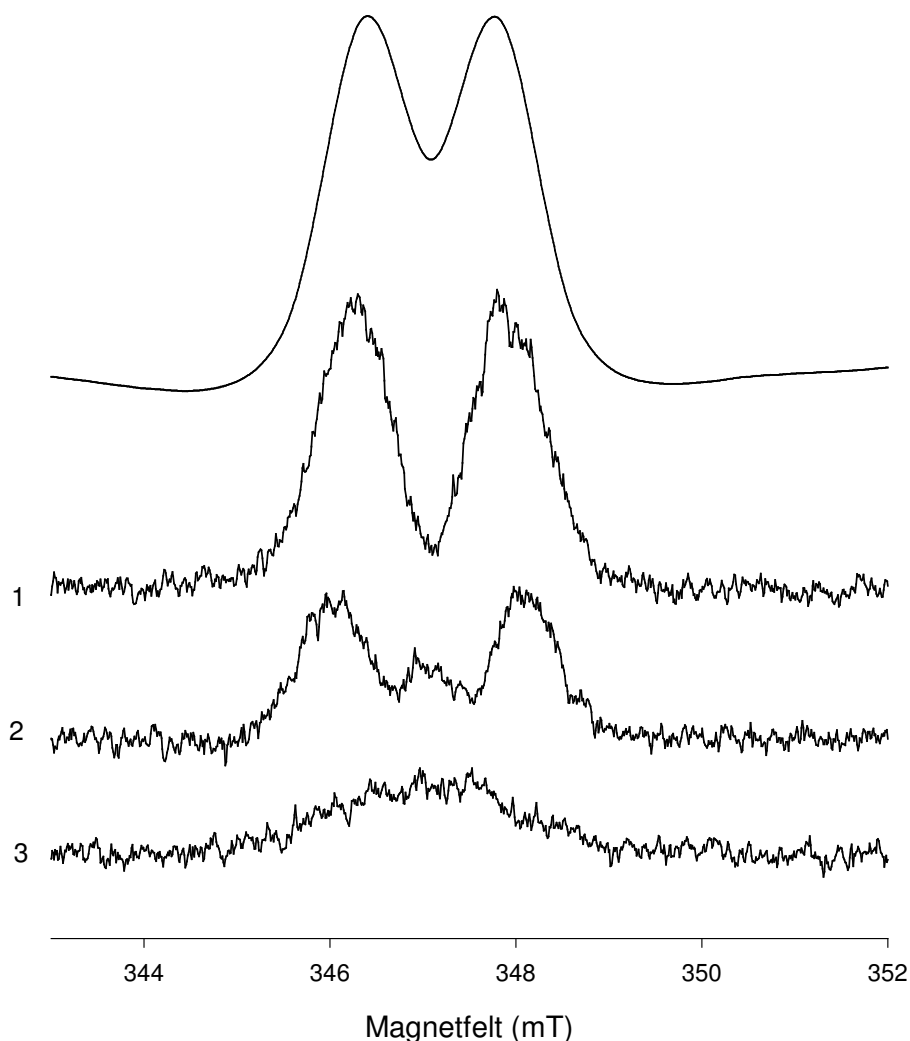
Tensor 2 har prinsipalverdier som er typisk for en N-H α -vekselvirkning, siden slike koblinger har maksimale (i absoluttverdi) og intermediære prinsipalverdier som er relativt like. Det er derfor antatt negativ isotropverdi for tensor 2. En $Q_{\text{N-H}}$ verdi på omkring -80 MHz (34) gir ved McConnells relasjon en nitrogenspinntetthet på 0.12.

4.3 FSE

Ved rotasjon om $\langle c \rangle$ (og $\langle a \rangle$) er det tatt opp FSE-spektre. Med magnetfeltet rettet langs $\langle b \rangle$ finnes ved den høyfrekvente ENDOR-linjen, omkring 33 MHz vist i figur 4.10, to topper i FSE-spekteret som er vist i figur 4.11. Dette har en form som ligner på ESR-absorpsjonspekteret. FSE-spekteret fra ENDOR-linjen omkring 20 MHz viser i hovedsak en dublett, men har i tillegg en struktur i midten av resonansen. FSE-spektrene assosiert til flere andre lavfrekvente ENDOR-linjer viser én resonans med samme bredde som dublettspektrene. Ved rotasjon om $\langle a \rangle$ er situasjonen den samme, den høyfrekvente linjen gir et to-toppet FSE-spekter og linjen omkring 20 MHz gir et spekter med antydning til to topper. I begge rotasjonsplanene har både FSE- og ESR-spektrene en bredde på omkring 3-4 mT.



Figur 4.10: ENDOR-spekter av bestrålt *N*-formylglysin. Magnetfeltet er rettet parallelt med $\langle b \rangle$. Figuren viser det lavfrekvente området sammen med den relevante delen av det høyfrekvente. Linjenummer angir tilhørende FSE-spekter i figur 4.11 Fri-proton-frekvensen er markert ved 14.825 MHz.

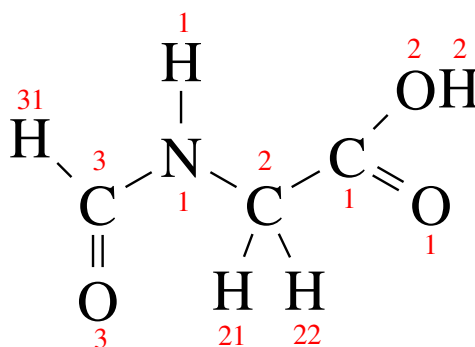


Figur 4.11: Øverst vises et ESR-absorpsjonsspekter som er framkommet ved integrasjon av det eksperimentelle (1.deriverte) spekteret av røntgenbestrålt krystall av *N*-formylglysin. De nummererte spektrere (1-3) er FSE-spektrere. Alle fire spektrere er tatt opp ved rotasjon om $\langle c \rangle$, magnetfeltet er rettet parallelt med $\langle b \rangle$. FSE-spektrere er tatt opp med magnetfeltet låst til ENDOR-linjene i figur 4.10, først ved 33.193 MHz (1) og deretter i tur til linjene 19.919 MHz (2) og 17.574 MHz (3).

4.4 Radikalstruktur

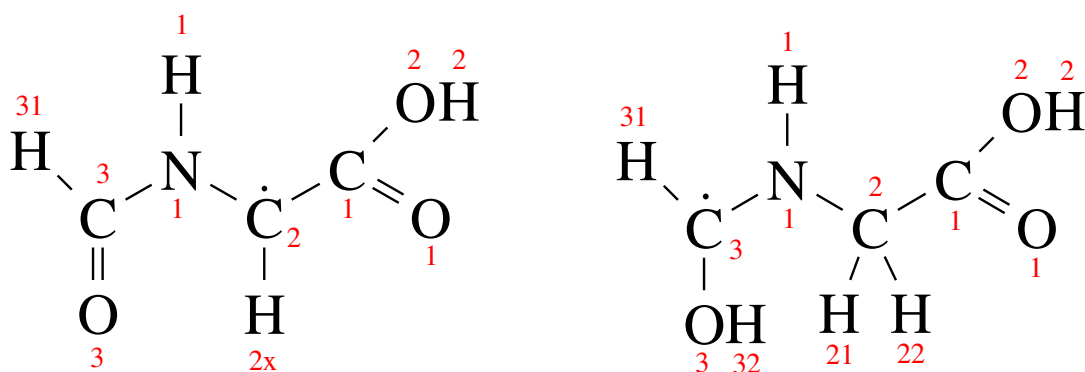
Det er tidligere gjort en rekke ESR- og ENDOR-studier av bestrålt glysin hvor det er funnet mange forskjellige radikaler (43-45). I og med at glysin generelt gir opphav til mer komplekse ESR- og ENDOR-spektrere enn *N*-formylglysin, kan ikke resultatene sammenlignes umiddelbart. Først og fremst skyldes dette to til tre ekvivalente protoner som er bundet til nitrogenatomet i glysinmolekylet. *N*-acylerte glysinderivater har ingen

slik NH_3 -gruppe, og kan derfor lettere sammenlignes med *N*-formylglysin. Miyagawa *et al.* (46) beskriver det stabile *N*-acetylglysin-radikalet som observeres i romtemperatur ($\text{CH}_3\text{CO-NH-C}^\bullet\text{H-COOH}$). I bestrålt glycyglysin har Katayama og Gordy (47) også observert en dublettstruktur som skyldes en netto hydrogenabstraksjon fra CH_2 -gruppen. I begge disse tilfellene er det en dublettstruktur i ESR-spektrene hvor det antas at uoppløste *N*- og *N*-H-koblinger bidrar til økte linjebredder. Et lignende radikal kan tenkes å opptre i bestrålt *N*-formylglysin (figur 4.13a). Et annet eksempel på *N*-acylerte glysinderivater er hippursyre hvor formylgruppen er erstattet med en fenylgruppe (48).



Figur 4.12: Nummerering av atomene i *N*-formylglysin-molekylet.

I figur 4.12 vises den generelle atomnummereringen av *N*-formylglysin som er brukt i det foreliggende arbeidet. To mulige modeller for et *N*-formylglysin-radikal som kan tenkes å samsvare med de eksperimentelle data er undersøkt, ettersom en C-H α -kobling som tensor 1 (tabell 4.3) kun kan observeres på C2- eller C3-sentrerte radikaler, så lenge det ikke finner sted svært store endringer. En kandidat, **K1**, er ”glysinradikalet” $\text{CHO-NH-C}^\bullet\text{H-COOH}$, hvor det uparede spinnet sitter på et sentralt karbonatom (C2) i glysinstammen. En annen kandidat er **K2**, ”formylradikalet” $\text{C}^\bullet\text{HOH-NH-CH}_2\text{-COOH}$, der det uparede spinnet er lokalisert til C3 i formylgruppen i molekylet. Disse to radikal-kandidatene er vist i figur 4.13. For å kunne si noe om hvilken av kandidatene som kan være mest sannsynlig, må hyperfinkoblingstensorenes egenvektorer fra tabell 4.3 sammenlignes med retninger beregnet ut fra krystallografiske data.



a) K1

b) K2

Figur 4.13: To forslag til radikalstruktur til radikal dannet i røntgenbestrålte krystaller av *N*-formylglysin i romtemperatur. a) "Glysinradikalet" K1 og b) "Formylradikalet" K2.

Radikalkandidat K1

K1 dannes ved en netto hydrogenabstraksjon på C2. *N*-formylglysin-molekylet er plant, bortsett fra de to hydrogenatomene H21 og H22 som stikker ut av planet. For nødvendige beregninger av koordinater er det for K1 antatt at ett av de to omtalte hydrogenatomene mistes og at de gjenværende atomene reorganiseres slik at radikalet blir plant. En slik reorganisering er også tilfellet for de tilsvarende radikalene i *N*-acetylglisin (46) og glycyglysin (47). Det gjenværende H-atomet kalles H2x og retningen C2-H2x er beregnet ut fra vektorsummen av C1-C2 og N1-C2. Tensor 1 er en C-H $_{\alpha}$ -kobling og i K1 vil den assosieres til C2-H2x. Retningen C2-H2x avviker 17° fra minimalretningen (mest positive prinsipalverdi) til tensoren, mens p $_z$ -retningen regnet ut fra C1-C2-N1 i molekylplanet avviker 16° fra intermediærretningen. Det kan godt tenkes at en eventuell H2x-plassering er forskjellig fra den beregnede og at dette igjen får følger for beregning av p $_z$ -retningen. Når minimalretningen og intermediærretningen avviker like mye, kan det bety at hele fragmentet er rotert i forhold til den antatte posisjonen.

Tensor 2 har en intermediærretning som ikke avviker mye fra tilsvarende retning for tensor 1. Tensorens form kan best passe til en N-H α -kobling, det må i dette tilfellet (K1) være N1-H1. N1-H1-retningen, som i utgangspunktet antas å være uendret i K1 i forhold til det uskadde molekylet, avviker imidlertid 44° fra tensorens minimalretning. Her vil vekselvirkningen mellom H1 og spinnet på C2 kunne komplisere situasjonen. C2---H1-retningen avviker 50° fra maksimalretningen når tensor 2 tolkes som en β -kobling.

Radikalkandidat K2

K2 dannes ved netto hydrogenaddisjon på O3. Det adderte hydrogenatomet kalles H32 og det antas at dette ligger i samme plan som resten av molekylets hovedstruktur. K2s kandidat til C-H α -koblingen er C3-H31. Den krystallografiske C3-H31-retningen avviker hele 57° fra minimalretningen til tensor 1, mens p $_z$ -retningen regnet ut fra CHO-gruppen bare avviker 9° fra tensorens intermediærretning. Når avvikene er så forskjellige, framstår dette alternativet som lite sannsynlig.

Den eneste mulige N-H α -kobling er også for K2 N1-H1. Minimalretningen avviker, på samme måte som i K1, 44° fra N1-H1-retningen ettersom det antas at denne retningen er felles for de to radikalkandidatene. Retningen C3---H1 avviker 73° fra maksimalretningen når tensor 2 tolkes som en β -kobling.

INDO- og dipol-beregninger

INDO-beregninger for K1 gir en p $_z$ -spinnthet på C2 på 0.57 og en spinnthet på N1 på 0.14. For K2 gir INDO-beregninger en p $_z$ -spinnthet på 0.67 på C3 og en spinnthet på N1 på 0.21. Siden den eksperimentelle isotropverdien gir en nitrogenspinnthet på 0.12, er N1-spinntheten beregnet for K2 for stor dersom tensor 2 tilhører en N-H α -kobling. En teoretisk beregning av en N-H α -kobling kan gjøres ved hjelp av programmet *dipol*. Når spinnthetene på C og N er henholdsvis 0.6 og 0.1, blir typiske dipolare tensorverdier beregnet til å være 13.5/-5.5/-8.2 MHz. Disse verdiene er mye større enn de eksperimentelle observasjonene (tensor 2, tabell 4.3). Tensor 2 kan imidlertid i stor grad gjenskapes ved hjelp av *dipol* ved å benytte en spinnthet på 0.42 på C2 og -0.075 på N1. Retningsavviket fra K1 er da 12-14° for minimal- og maksimalretningene. Det er vanskelig å finne noen god forklaring på den negative spinntheten på nitrogen og på den lave spinntheten på karbonatomet. (Eneste mulighet er en allyltype C-N-C, men da vil det i tillegg være såpass stor spinnthet på C3 at det burde vises i en C-H α -kobling i tillegg til koblingen til H1.) Det er ikke mulig å rekonstruere en passende N-H α -kobling ved hjelp av *dipol* med avstander, retninger og vinkler som samsvarer med K2.

Ettersom det er vanskelig å finne en god begrunnelse for at tensor 2 virkelig er en N-H α -kobling er det naturlig å lete etter andre løsninger. En mulighet er γ -koblingen C2---H31.

C2---H31-retningen viser seg å ha et avvik fra maksimalretningen til tensor 2 på 38°. Denne tolkningen av tensor 2 er ikke aktuell i forbindelse med radikalstruktur K2 siden tensor 1 i det tilfellet allerede er assosiert til en C3-H3 α -kobling.

DFT-beregninger

En foreløpig konklusjon på bakgrunn av prinsipalretninger for tensor 1 er at K1 passer best med hensyn på α -koblingen. For å få flere holdepunkter før endelig radikalbestemmelse ble det i tillegg gjort beregninger med Density Functional Theory (30) for å finne optimale geometrier for radikaler, samt spintettheter og størrelsen på hyperfinkoblingene. En nærmere beskrivelse av DFT med basissett og funksjonaler er beskrevet i kapittel 3.7 og et eksempel på en input-fil er gitt i appendiks A.

For N-formylglysin ble DFT-beregninger gjennomført på de to aktuelle radikal-kandidatene. For optimalisering av radikalkandidatenes struktur ble funksjonalen B3LYP og basissettet 6-31+G(d) benyttet. Full geometrisk optimalisering gikk smertefritt, ingen vinkler eller avstander ble holdt konstant og resultatgeometrien viste et plant molekyl. For beregning av hyperfinkoblinger på den optimaliserte strukturen ble basisen 6-311+G(2df,p) benyttet med samme funksjonal som før. De DFT-beregnete koblingsverdiene gitt i tabell 4.4 (K1) og tabell 4.5 (K2) kan sammenlignes med de eksperimentelle resultatene (tabell 4.3). DFT-beregningene gir også tensorenes egenvektorer, i internt system $\langle xyz \rangle$. Disse egenvektorene kan sammenlignes med den optimaliserte molekylstrukturen.

K1-beregninger

For K1 ble det ikke gitt noen klar føring på H2x-plasseringen, bare normal C-H bindingsavstand fra C2 og en standard (sp^2) vinkel fra C-C-bindingen. Resultatet viser likevel et plant molekyl som antatt.

Tabell 4.4: Utvalg av DFT-beregnete hyperfinkoblinger for et mulig radikal K1 i N-formylglysin. Full geometrisk optimalisering. Egenvektorene er angitt i et internt system <xyz>. Retninger for den optimaliserte strukturen som er gitt nederst i tabellen er også angitt i dette systemet.

Tensor	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Prinsippalverdier (MHz)	Egenvektorer			
				<x>	<y>	<z>	
K1	H2x	-42.480	-24.691	-67.171	0.9987	0.0000	-0.0509
			-1.112	-43.592	0.0000	1.0000	0.0000
			25.803	-16.677	0.0509	0.0000	0.9987
	H1	-8.726	-5.230	-13.956	0.9976	0.0000	0.0698
			-4.628	-13.354	0.0000	1.0000	0.0000
			9.858	-18.584	-0.0698	0.0000	0.9976
	N1	-0.231	-6.150	-6.381	0.2655	0.0000	0.9641
			-5.439	-5.670	0.9641	0.0000	-0.2655
			11.589	-11.820	0.0000	1.0000	0.0000
	H31	-5.670	-3.481	-9.151	0.2760	0.0000	0.9611
			-2.163	-7.833	0.0000	1.0000	0.0000
			5.644	-0.026	0.9611	0.0000	-0.2760
Retninger for den optimaliserte strukturen til K1:							
C2-H2x				0.0006	0.0000	1.0000	
normal til C1-C2-N1				0.0000	1.0000	0.0000	
N1-H1				-0.0476	0.0000	-0.9989	
C2---H1				0.5664	0.0000	-0.8241	
C3-H31				0.7532	0.0000	-0.6578	
normal til H31-C3-O3				0.0000	1.0000	0.0000	

Tabell 4.4 viser at den DFT-beregnete isotropverdien til H2x (C-H_α) for K1 er nokså nær isotropverdien til tensor 1 (-48.3 MHz, tabell 4.3). Prinsippalverdiene til K1 er av samme størrelsesorden som i tensor 1 (-72.4, -48.2, -24.4).

Den optimaliserte resultatgeometrien fra K1-DFT viser at retningene N1-H1 og C2-H2x er antiparallele. I den opprinnelig foreslåtte K1-geometrien (på bakgrunn av krystallografiske data) er retningen C2-H2x *ikke* antiparallell med N1-H1-retningen (16° avvik). Samtidig danner den opprinnelige N1-H1-retningen 178° med minimalretningen til tensor 1. Dette kan bety at K1-radikalstrukturen har C2-H2x og N1-H1-retninger som etter en reorganisering blir antiparallele og at C2-H2x dermed er parallell med minimalretningen til tensor 1. (Avviket på 16° er i overensstemmelse med avviket mellom opprinnelig beregnet C2-H2x og minimalretningen til tensor 1.) Tabell 4.4 viser også at de DFT-beregnete koblingene H2x og H1 har parallelle prinsippalretninger, og deres p_z-retning er identisk med maksimalretningen til N-koblingen. Via McConnells relasjon blir p_z-spinn tettheten 0.58 på C2. Bernhards relasjon gir 0.67.

Tensor 2 har eksperimentell $a_{\text{iso}} = -9.6$ MHz (tabell 4.3). Dette er svært nær den DFT-beregnete H1-koblingen til K1 (-8.7 MHz, tabell 4.4), men de anisotrope bidragene avviker en del. H1 vil her måtte inkludere både N1-H1 $_{\alpha}$ og C2---H1, noe DFT muligens ikke gjør. McConnells relasjon gir en nitrogenspinntetthet på 0.11. Det kan også tenkes at tensor 2 ikke er en N-H-kobling, men en C2---H31 γ -kobling. Tabell 4.4 viser at de anisotrope bidragene i H31-koblingen ikke avviker alt for mye i forhold til tensor 2, og stemmer bedre overens med eksperimentelle data enn det H1-koblingen gjør. Isotropverdien til H31 avviker imidlertid mer enn H1 fra den eksperimentelle isotropverdien. DFT-beregningene gir ikke noe klart svar på hvilket alternativ som er mest sannsynlig, det er imidlertid ingenting som viser at det observerte radikalet ikke kan være K1.

K2-beregninger

For K2 ble et hydrogenatom addert til O3 med standard bindingsavstand og vinkel.

Tabell 4.5: Utvalg av DFT-beregnete hyperfinkoblinger for et mulig radikal K2 i N-formylglysin. Full geometrisk optimalisering. Egenvektorene er angitt i et internt system $\langle xyz \rangle$. Retninger for den optimaliserte strukturen som er gitt nederst i tabellen er også angitt i dette systemet.

Tensor	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Prinsipalverdier (MHz)	Egenvektorer		
				$\langle x \rangle$	$\langle y \rangle$	$\langle z \rangle$
K2	H31	-36.978	-101.631	0.6396	0.0000	0.7687
		5.006	-59.647	0.0000	1.0000	0.0000
		31.972	-32.681	0.7687	0.0000	-0.6396
	H1	-13.168	-29.648	0.9489	0.0000	-0.3154
		-4.429	-20.909	0.0000	1.0000	0.0000
		17.597	1.117	0.3154	0.0000	0.9489
N1	-10.845	-7.568	-0.1036	0.0000	0.9946	
	3.277	-6.961	0.9946	0.0000	0.1036	
	21.083	24.360	0.0000	1.0000	0.0000	
Retninger for den optimaliserte strukturen til K2:						
C3-H31				0.7731	0.0000	-0.6343
normal til O3-C3-H31				0.0000	1.0000	0.0000
N1-H1				-0.1954	0.0000	-0.9807
C3---H1				-0.7279	0.0000	-0.6856

Tabell 4.5 viser DFT-beregnete hyperfinkoblinger for K2. Både isotropverdien til H31 (C3-H $_{\alpha}$) og de tilhørende prinsipalverdiene avviker mye fra tensor 1 (tabell 4.3). Via McConnells relasjon blir p_z -spinntettheten 0.89 på C3. Bernhards relasjon gir 0.83. Heller ikke for tensor 2 vil DFT-beregninger med K2 gi tilfredsstillende resultater for H1, både isotropverdiene og de anisotrope bidragene er alt for store. Ved McConnells relasjon

beregnes nitrogenspinntettheten til 0.21. DFT-beregningene viser at K2 sannsynligvis ikke er ansvarlig for resonansen i bestrålt N-formylglysin.

Sammenligning av spinntettheter

Spinntettheter er beregnet på flere måter. Med utgangspunkt i eksperimentelle resultater og DFT-beregninger er spinntetthetene estimert ut fra koblingsstørrelsene ved hjelp av McConnells relasjon og Bernhards relasjon. I tillegg ble det gjort INDO-beregninger av spinntetthet. I tabell 4.6 er de ulike spinntetthetene sammenlignet for om mulig å finne flere argumenter for og mot K1 og K2.

Tabell 4.6: Sammenligning av p_z -spinntettheter beregnet ut fra eksperimentelle og teoretiske data.

	McConnell (ekspr. / DFT)	Bernhard (ekspr. / DFT)	INDO
Eksperimentelt	0.66	0.62	
K1 (C2 [*])	0.58	0.67	0.57
K2 (C3 [*])	0.89	0.83	0.67

Tabell 4.6 viser at K2 (C3^{*}) både fra INDO og fra DFT får en høyere spinntetthet enn K1 (C2^{*}). Hvis vi ser bort fra INDO-beregningene er det ingen tvil om at K1 passer best med de eksperimentelle data. INDO-spinntetthetene går mest i favør av K2.

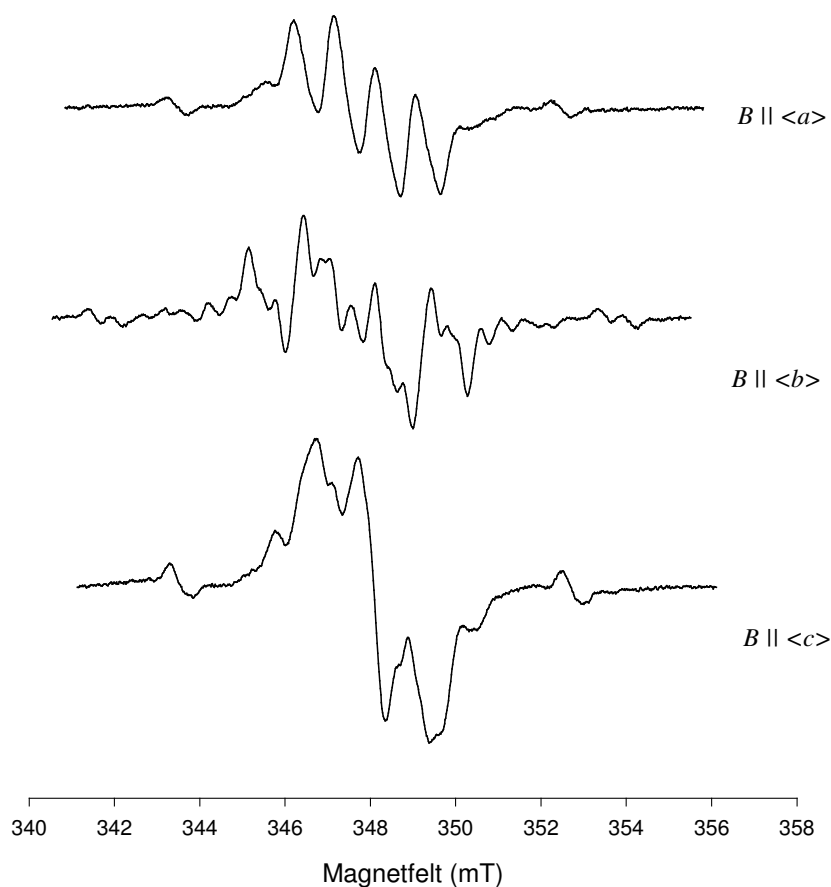
Oppsummering N-formylglysin

Til tross for store usikkerheter og sprikende resultater, vil en totalvurdering av koblingsstørrelser, retninger og spinntettheter gi grunnlag for å anta at glysinradikalet K1 er det observerte radikalet i N-formylglysin bestrålt ved romtemperatur. Dette innebærer en netto hydrogenabstraksjon fra C2 (figur 4.13a).

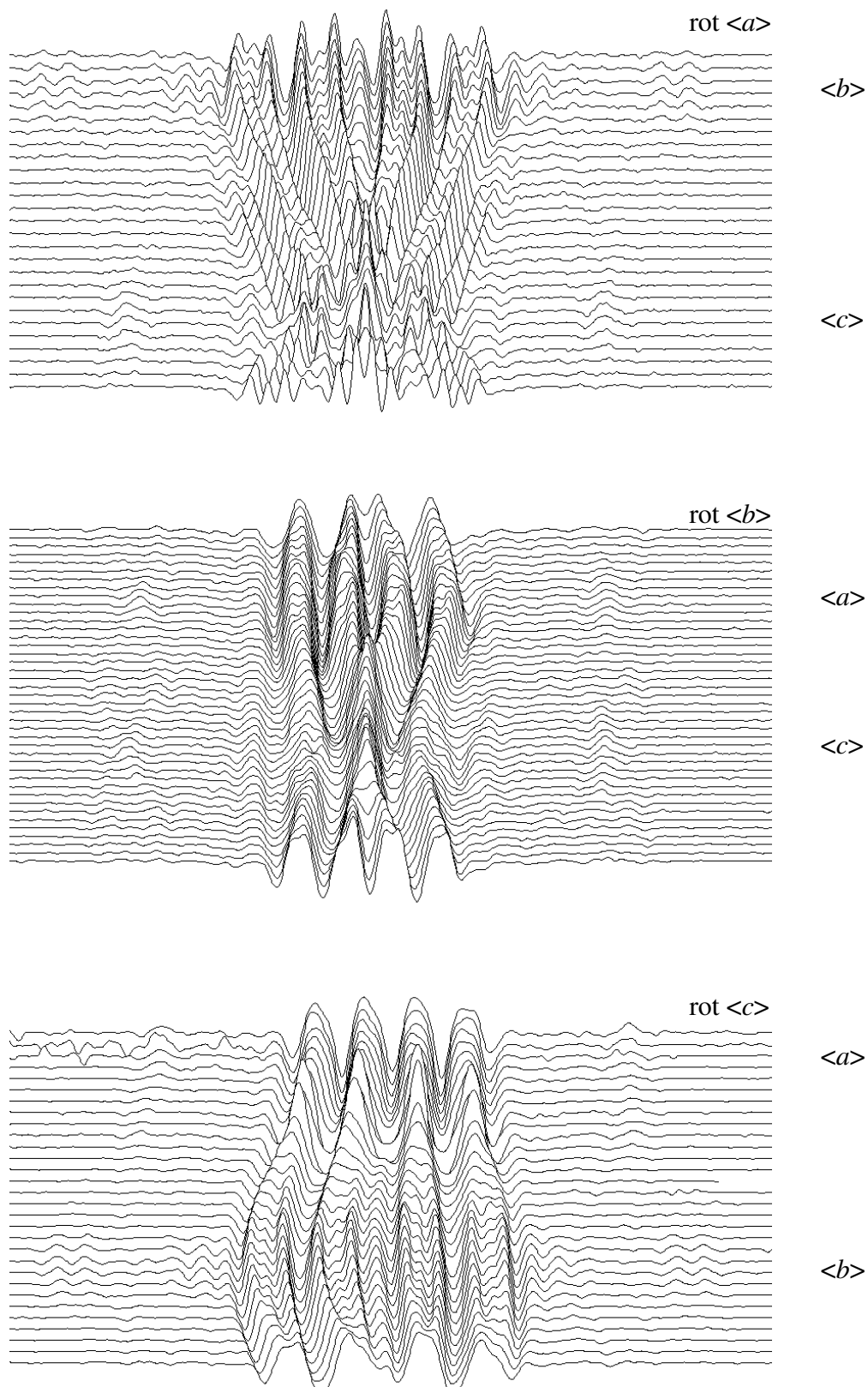
5 Cytosin:N-formylglysin

5.1 ESR-resultater

Komplekskrystaller av cytosin:N-formylglysin ble røntgenbestrålt ved romtemperatur i 90-240 minutter, noe som tilsvarer en dose på 35-105 kGy. ESR-spektre ble tatt opp for hver 5. grad, ved opptil 200 graders rotasjon om de tre krystallografiske aksene og med en sweepbredde på 15 mT. Figur 5.1 viser 1.deriverte ESR-spektre tatt opp med magnetfeltet langs aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$. Sentralt i disse spektrene ses en markert kvartett-triplett struktur. På hver side av denne kvartetten observeres svakere resonanslinjer. En sentralresonans som ses her har tidligere ikke blitt observert i noen cytosinderivater (14, 15). Det er derfor rimelig å anta som arbeidshypotese at dette er et produkt assosiert til glysindelen av komplekset. Linjene på hver side er imidlertid karakteristiske for flere cytosinsentrerte radikaler, mens resonanser med tilsvarende bredde ikke tidligere er observert i glysin(derivater) (43, 45, 47, 49).



Figur 5.1: Førstederiverte ESR-aksespektre av enkrytaller av cytosin:N-formylglysin, bestrålt og målt ved romtemperatur.



Figur 5.2: Andrederiverte ESR-spektre av krystaller av cytosin:*N*-formylglysin, bestrålt og målt ved romtemperatur. Spektrene er tatt opp ved rotasjon om de krystallografiske aksene $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$.

ESR-spektre av den bestrålte komplekskrystallen inneholder relativt mye strukturell informasjon i form av hyperfinoppsplittinger sammenlignet med ESR-spektre av isolert *N*-formylglysin. Fire hovedlinjer dominerer sentralresonansen. Disse viser (se figur 5.2) en triplett understruktur som er tydeligst når magnetfeltet er parallelt med $\langle b \rangle$. Med magnetfeltet langs $\langle c \rangle$ går de fire linjene sammen til en triplett. De fire hovedlinjene er i analysen assosiert til to proton-koblinger, mens triplett-understrukturen er blitt assosiert til en nitrogenkobling. Den minste av protonkoblingene viser lite anisotropi, mens det er markert anisotropi i den største av disse koblingene. I tillegg observeres det noe *g*-anisotropi for sentralresonansen.

Ettersom det ikke lyktes å få brukbare ENDOR-signaler fra cytosin:*N*-formylglysin, ble ESR-resultatene benyttet til å beregne både hyperfinkoblinger og *g*-tensor. Dette medfører en større usikkerhet i prinsipalverdier og ikke minst i prinsipalretninger enn det som er tilfelle ved bruk av ENDOR-resultater.

Tabell 5.1: *g*-tensor for sentralresonansen i bestrålte cytosin:*N*-formylglysin krystaller ved romtemperatur, beregnet ved hjelp av *magres*. Tallene i parentes angir usikkerheten i de siste sifrene i prinsipalverdiene. Egenvektorene har en usikkerhet i alle sifre, derfor er bare hovedtrekkene i retningene gitt.

	Prinsipal- verdier (MHz)	Egenvektorer		
		$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$
g	2.0037 (3)	0.0	0.9	-0.4
	2.0033 (3)	0.0	0.4	0.9
	2.0032 (2)	1.0	0.0	0.0

Tabell 5.1 viser at sentralresonansens *g*-tensor er relativt isotrop. Prinsipalverdiene er noe lavere enn for *N*-formylglysin. Ingen av rotasjonsplanene gir et klart bilde av *g*-variasjonen (slik som for *N*-formylglysin i figur 4.3), og usikkerheten er relativt stor. Verdiene antyder en maksimalretning for *g* nær $\langle b \rangle$ og en minimalretning nær $\langle a \rangle$.

En ortorombisk krystall forventes å vise site-splitting i alle plan (bortsett fra på aksene). I figur 5.2 vises muligens antydning til slik splitting, spesielt for rotasjon om $\langle a \rangle$, men tensorberegninger gjort med og uten hensyn til dette viser at forskjellen er marginal. Som for isolert *N*-formylglysin kan det tenkes at store linjebredder skjuler site-splittingen. Dersom hyperfinsplittinger har sin maksimale og minimale verdi når magnetfeltet er rettet langs en av aksene, er det ikke mulig å skille sitene. I dette tilfellet har begge

splittingstensorene prinsipalverdier nær aksene (figur 5.2 og tabell 5.2), og dermed observeres lite eller ingen site-splitting. Ved rotasjon om $\langle b \rangle$ er det tydeligere site-splitting for sideresonansen. Generelt vises ytterlinjene i spektrene tydeligst nær aksene, og de kan ikke følges over hele plan. Dette kan skyldes at det er to radikaler som bidrar ved hver sine orienteringer på grunn av ulik variasjon i linjebredde.

Fra spektrene i figur 5.2 går det tydelig fram at den største og mest anisotrope hyperfinsplittingen i sentralresonansen har en maksimalverdi omkring $\langle b \rangle$. Minimal splitting finnes langs $\langle c \rangle$. Ved denne orienteringen danner kvartetten en triplett, fordi de to koblingene har omtrent samme verdi. Langs $\langle a \rangle$ finner vi en intermediærverdi. Alle disse betraktningene bekreftes av de beregnede koblingstensorene som er gitt i tabell 5.2. Den antatte nitrogen-triplettsplittingen, som i ESR-spektrene kan ses tydeligst nær $\langle b \rangle$ og ellers ved rotasjon om $\langle a \rangle$, har relativt liten anisotropi, men skjules bak store linjebredder ved mange orienteringer. Splittingens maksimalverdi antas å være omkring $\langle b \rangle$, og har en absoluttverdi av størrelsesorden 10 MHz.

Tabell 5.2: Hyperfinkoblingstensorer for sentralresonansen i krystaller av cytosin:N-formylglysin, bestrålt og målt ved romtemperatur. Tensor 1 og 2 er beregnet ved hjelp av *magres*. Tallene i parentes angir usikkerheten i de siste sifrene. Nitrogenkoblingen er anslått ut fra ESR-spektrene i figur 5.2.

	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Prinsipalverdier (MHz)	Egenvektorer		
				$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$
1	-55.60 (83)	-26.37 (87)	-85.19 (27)	0.0706 (275)	-0.9964 (28)	-0.0461 (277)
		-3.22 (86)	-52.38 (22)	0.9949 (23)	0.0736 (276)	-0.0684 (238)
		29.59 (93)	-29.23 (41)	0.0716 (236)	-0.0410 (279)	0.9966 (21)
2	30.74 (41)	-4.50 (47)	26.23 (23)	0.0076 (657)	-0.1862 (3717)	0.9825 (127)
		-2.82 (47)	27.92 (22)	1.0000 (124)	0.0032 (1010)	-0.0072 (657)
		7.31 (47)	38.06 (23)	0.0018 (832)	-0.9825 (29)	-0.1862 (3760)
N	≤ 10					
Krystallografiske retninger, cytosin:N-formylglysin, nummerering som i figur 5.4 og ellers i kapittel 5.2						
C8-H8x				0.6601	-0.0988	0.7447
Normal til planet C7-C8-N5				0.7512	0.0752	-0.6558
C8-H81				0.9914	0.0039	0.1311
C8-H82				-0.2735	-0.1053	0.9561
C8---H10				-0.5683	0.8227	0.0153
N5-H10				-0.7380	0.4207	0.5276
C9-H9				-0.4096	0.8764	-0.2533
Normal til planet N5-C9-H9				0.6533	0.4756	0.5891
C9---H10				-0.5913	-0.1431	0.7937
cytosin ringnormal				-0.7749	0.0333	0.6312

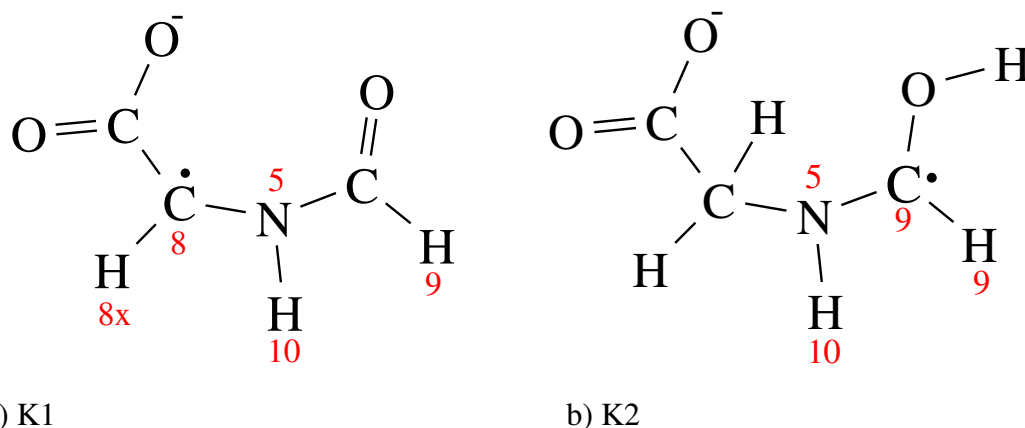
Tabell 5.2 viser at de to proton-tensorene har egenvektorer som så godt som sammenfaller med enhetscelleaksene. Nitrogenkoblingens verdier er anslått ut fra ESR-spektrene, mens de andre koblingene er beregnet ved hjelp av *magres*. Forholdet mellom prinsiplverdiene til tensor 1 indikerer en C-H $_{\alpha}$ -type kobling ($-a_d, -2a_d, -3a_d$), og tensor 1 antas derfor å ha negativ isotropverdi. På samme måte som for N-formylglysin finnes spinntheteten på α -karbonatomet ut fra $a_{iso} = -55.6$ MHz ved McConnells relasjon til å være 0.76. Også Bernhards relasjon gir med $a_d = 29.6$ MHz (fra tabell 5.2) en spinnthet på 0.76. Tabellen viser også at intermediærretningen til α -koblingen er tilnærmet parallell med minimalretningen til g-tensoren (tabell 5.1). Cytosindelens plannormal avviker 36° fra intermediærretningen til α -koblingen og avviket fra g-tensorens minimalretningen er av samme størrelsesorden. Det er lite sannsynlig at det skjer så store endringer med cytosinplanet ved radikaldannelsen, derfor er det rimelig å anta at arbeidshypotesen om at sentralresonansen skyldes et radikal i glysidelen er riktig.

Tensor 2 har nær aksialsymmetriske prinsiplverdier, noe som er typisk for en β -kobling. Det antas derfor at isotropverdien er positiv. Ingen av de krystallografiske retninger som er presentert i tabell 5.2 stemmer spesielt bra overens med de prinsiplretninger for tensor 1 og 2 som det kan være naturlig å sammenligne med. Dette kan tyde på at det har vært en betydelig omorganisering av atomene etter radikaldannelsen.

5.2 Radikal i aminosyredelen

N-formylglysin-molekylet er i utgangspunktet plant, som vist i figur 5.3a og figur 3.4, men når det bindes til cytosin via to til tre hydrogenbindinger skjer det store endringer i geometrien. To av torsjonsvinklene avviker etter kompleksdannelsen nærmere 80° fra normale torsjonsvinkler for plane molekyler. Dette betyr at molekylet er vridd på midten (23). Denne rotasjonen framgår tydelig av figur 5.3b. Atomene O3-O4-C7-C8-N5 (nummerering gitt i figur 5.4) danner ett plan, mens C8-N5-(H10)-C9-O5-H9 danner et annet plan. Plannormalene for disse to står nesten normalt på hverandre. Dette viser at det har vært en betydelig rotasjon (nær 80°) om C8-N5-bindingen. Figur 5.3b viser også at den relativt store avstanden til H-atomet i karboksylgruppen av *molDraw* regnes som en hydrogenbinding, noe som betyr at hydrogenatomet som var bundet til O4 før kompleksdannelsen er gått over til cytosindelen av komplekset C:NFG. Dette er som

spinnet lokaliseres til C8. Det gjenværende hydrogenatomet kalles i dette tilfellet H8x, og antas å befinne seg i C7-C8-N5-planet. Retningen C8-H8x beregnes ut fra vektorsummen av C7-C8 og N5-C8. I K2 (figur 5.5b) er det uparede spinnet lokalisert til C9 etter en netto hydrogenaddisjon til O5. For å finne den mest aktuelle radikalkandidaten sammenlignes tensorenes prinsipalretninger med krystallografiske retninger gitt i tabell 5.2.



Figur 5.5: To mulige radikalstrukturer til radikal dannet i *N*-formylglysin-delen av komplekskrystallen C:NFG etter røntgenbestråling og deteksjon ved romtemperatur, a) K1 og b) K2.

Radikalkandidat K1

Ved å betrakte K1 (figur 5.5a) beregnes avviket mellom minimalretningen til tensor 1 og C8-H8x-retningen til 37°, dette er identisk med avviket mellom intermediærretningen til tensor 1 og normalen til planet C7-C8-N5. Et slikt internt samsvar kan tyde på at hele fragmentet er rotert 37° om C8-N5-bindingen.

Tensor 2 har en maksimalretning som avviker 36° fra den krystallografiske C8---H10-retningen som er det eneste alternativet for en C---H β-kobling. Heller-McConnell-relasjonen (21) gir at isotropverdien til en β-kobling avhenger av $\cos^2\theta$, via $a_{\text{iso}}^{\beta} = (B_0 + B_2 \cos^2\theta)\rho^{\pi}$, der θ er vinkelen mellom planet utspent av H_β-N_β-C_α og planet utspent av N_β-C_α-p_z. Med en spinn tetthet på 0.76 fra McConnells relasjon, sammen med B₀ på -4.3 MHz og B₂ på 117.6 MHz hentet fra en tilsvarende C-N-H-kobling i alanin (52), kan den eksperimentelle isotropverdien for tensor 2 gjenskapes når θ settes til 128°. For den opprinnelig antatte radikalstrukturen for K1 er θ 171°. Det gir et bidrag fra $\cos^2\theta$ på 0.97 og en a_{iso}^{β} (med samme B₀, B₂ og spinn tetthet som over) på 83.8 MHz. En

endring i θ på 43° (171° - 128°) er i god overensstemmelse med antakelsen om en rotasjon av CH-fragmentet (deriblant også C8- p_z) om C8-N5-bindingen på 37° ved radikal-dannelsen. Retningsavviket for tensor 2 på 36° fra C8---H10 skyldes trolig spinnthet på både N5 og C8.

Radikalkandidat K2

Ved å ta utgangspunkt i K2 (figur 5.5b) med spinnthet på C9 finnes avvikene 108° og 50° for henholdsvis C- H_α -retning og plannormal i forhold til minimal- og intermediær-retning for tensor 1. Sammen med et avvik på 90° mellom maksimalretningen til tensor 2 og C9---H10, som er eneste aktuelle β -kobling for denne radikalstrukturen, viser K2 seg som et lite sannsynlig alternativ også i komplekskrystallen. Et fraværende internt samsvar mellom avvikene gjør det allerede her aktuelt å eliminere K2 som et mulig alternativ.

DFT-beregninger

Det ble gjennomført DFT-beregninger av geometri og hyperfinkoblingsstørrelser for *N*-formylglysin-delen av komplekset. Selv om K2 allerede før beregningene framstod som lite sannsynlig, ble det gjort K2-beregninger ved hjelp av DFT for ordens skyld. Den geometriske optimaliseringen ble, som for isolert *N*-formylglysin, gjennomført med funksjonalen B3LYP og basis-settet 6-31+G(d), mens hyperfinkoblinger ble beregnet med 6-311+G(2df,p). Som det framgår av figur 5.3b) og c) er ikke molekylet plant. Det viste seg å være nødvendig å legge restriksjoner på torsjonsvinkler for å unngå at den geometriske optimaliseringen skulle resultere i et plant molekyl.

K1-beregninger

For K1 ble det ikke gitt noen klar føring på H8x-plasseringen, bare normal C-H bindingsavstand fra C8 og en standard (sp^2) vinkel fra C-C-bindingen. De to sentrale torsjonsvinklene (H10-N5-C8-C7 og C9-N5-C8-C7) måtte holdes konstant for at molekylet ikke skulle bli plant.

Tabell 5.3: DFT-beregninger med ett av de to mulige radikalene, K1, i aminosyredelen av komplekskrystallen cytosin:N-formylglysin. Beregningene er gjort uten hensyn til cytosindelen. To torsjonsvinkler er holdt konstant. Egenvektorene er angitt i et internt system $\langle xyz \rangle$. Retninger for den optimaliserte strukturen som er gitt nederst i tabellen er angitt i dette systemet.

Tensor	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Prinsipal-verdier (MHz)	Egenvektorer			
				$\langle x \rangle$	$\langle y \rangle$	$\langle z \rangle$	
K1	H8x	-55.795	-36.231	-92.026	0.9307	0.2283	-0.2857
			-0.711	-56.506	0.3258	-0.1625	0.9314
			36.942	-18.853	-0.1661	0.9599	0.2256
	H10	79.587	-6.188	72.399	0.6093	0.3849	0.6933
			-3.871	75.716	-0.2172	0.9219	-0.3209
			10.059	89.646	0.7626	-0.0449	-0.6453
	N5	-9.508	-0.659	-10.167	0.4179	0.8902	-0.1815
			0.059	-9.449	0.4436	-0.0256	0.8959
			0.600	-8.908	0.7928	-0.4549	-0.4056
	H9	-1.240	-2.541	-3.781	0.4380	0.8724	0.2170
			-1.788	-3.028	0.1687	-0.3169	0.9333
			4.329	3.089	0.8830	-0.3722	-0.2860
Retninger for den optimaliserte strukturen til K1:							
C8-H8x				-0.1313	0.9472	0.2925	
normal til planet C7-C8-N5				0.3459	-0.3061	0.8869	
C8---H10				0.6719	-0.0086	-0.7406	
N5-H10				0.1563	0.2940	-0.9429	
C9-H9				0.7221	0.2157	-1.8946	

Tabell 5.3 viser DFT-beregnete tensorer for K1. Den DFT-beregnete isotropverdi for H8x samsvarer svært bra med den eksperimentelle isotropverdien til tensor 1 (-55.6 MHz, tabell 5.2). Anisotropien er av samme størrelsesorden, men noe større enn i den eksperimentelle tensor 1. Isotropverdien gir ved McConnells relasjon en p_z -spinn tetthet på 0.77. Nitrogenkoblingen N5 som er beregnet her for K1 samsvarer med verdier som er anslått ut fra ESR-spektrene. I isolert N-formylglysin var den minste av de to koblingene foreslått å kunne tilhøre formyldelen av radikalet K1. I DFT-beregningen for K1 i kompleksdelen er imidlertid isotropverdien for den aktuelle H9 alt for liten, selv om de anisotrope bidragene er av riktig størrelsesorden. Den antatte β -koblingen til H10 har et anisotropt bidrag som er i rimelig samsvar med tensor 2, men DFT-beregningen gir isotropverdi som er mer enn dobbelt så stor og har motsatt fortegn som verdien beregnet fra de eksperimentelle data. Isotropverdien er imidlertid av samme størrelsesorden som verdien beregnet ved Heller-McConnells relasjon for C8---H10 ut fra opprinnelig antatt radikalstruktur (83.8 MHz).

I forbindelse med DFT-beregningene for K1 ble to torsjonsvinkler holdt konstant. Dihedralvinkelen $H_{\beta}-N_{\beta}-C_{\alpha}-p_z$, som i et plant molekyl vanligvis vil være omkring 90° , var på 171° for den opprinnelig antatte radikalstrukturen. I den DFT-optimaliserte strukturen var denne vinkelen fortsatt 171° , ettersom torsjonsvinkelen H10-N5-C8-C7 ble holdt konstant. Forskjellen i isotropverdi fra 31 MHz (i tensor 2) til 80 MHz (for den DFT-beregnete H10-koblingen) antas derfor i hovedsak å skyldes endring av dihedralvinkelen θ . Det vil si at geometrioptimaliseringen av K1 gir en annen konformasjon enn det som er tilfellet for radikalet som dannes i krystallen. Det er trolig ikke mulig å gjenskape radikalstrukturen i området rundt C8-N5-bindingen når flere torsjonsvinkler fryses i DFT-beregningen. Dihedralvinkelen som er beregnet ut fra geometrioptimaliseringen avviker 43° fra dihedralvinkelen beregnet fra de eksperimentelle data. Det ble ut fra de eksperimentelle data antatt en rotasjon av (p_z -)C8-H8x-fragmentet på 37° om C8-N5-bindingen i forhold til den opprinnelig antatte radikalstrukturen (som også er utgangspunkt for DFT-beregningene). Det synes dermed som om hele planet O3-O4-C7-C8-N5 er rotert ca 40° om C-N-bindingen i forhold til den opprinnelige posisjonen som var omkring 80° fra planet C8-N5-C9-O5-H9. Dette innebærer i så fall at de torsjonsvinklene som er frosset i DFT-beregningen kan være omkring 40° feil, og dermed gi en alt for stor isotropverdi for β -koblingen.

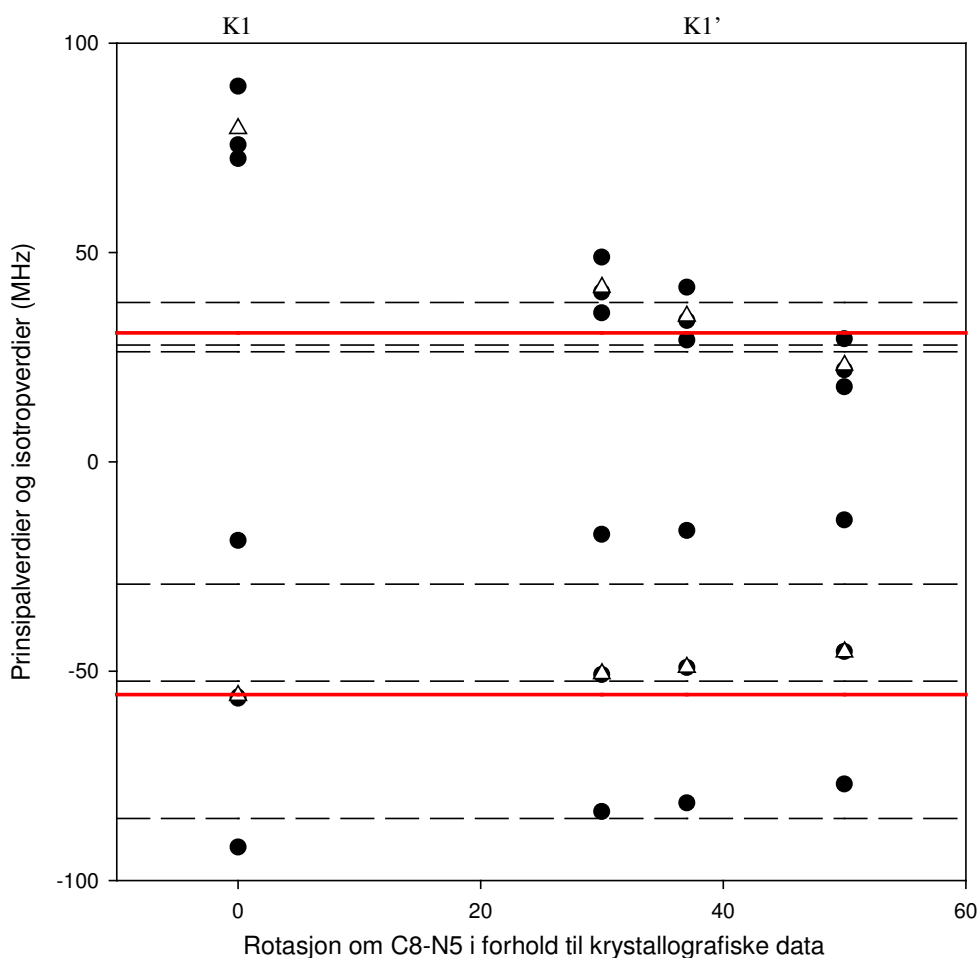
For å undersøke om en slik antatt planrotasjon om C-N-bindingen kan være reell, ble det gjennomført en ny beregning hvor det ble addert 37° til de to konstante torsjonsvinklene slik at dihedralvinkelen θ ble redusert. Resultatene fra den nye hyperfinkoblingsberegningen er vist i tabell 5.4.

Tabell 5.4: Ny DFT-beregning med K1 uten hensyn til cytosindelen. To torsjonsvinkler er holdt konstant, men økt 37° i forhold til den første K1-beregningen.

Tensor		Isotropverdi (MHz)	Prinsipalverdier (MHz)		
K1'	H8x'	-49.037	-81.523	-49.162	-16.426
	H10'	34.796	29.022	33.703	41.663
	N5'	-5.624	-7.222	-6.422	-3.228

Tabell 5.4 viser at den nye beregningen resulterte i en isotropverdi for H10' på 34.8 MHz. Dette er mye nærmere den eksperimentelle verdien (30.7 MHz) enn den første K1-beregningen (79.6 MHz). Samtidig fikk α -koblingen en noe lavere isotropverdi, men er

ellers mye mindre følsom for disse vinkelendringene enn β -koblingen. Også nitrogenkoblingen fikk en lavere isotropverdi, mens anisotropien økte noe. Imidlertid vil det gode samsvaret for H10' styrke hypotesen om at tensor 2 skyldes en β -kobling til H10, og at det har vært en rotasjon om C8-N5-bindingen. K1 er dermed en aktuell radikalkandidat. Videre ble det gjort to nye DFT-beregninger med torsjonsvinklene økt henholdsvis 30° og 50° i forhold til den første beregningen. Dette tilsvarer dihedralvinkler på henholdsvis 141° og 121° . Figur 5.6 viser den angulære variasjonen i prinsipal- og isotropverdier.



Figur 5.6: Hyperfinkoblingenes variasjon med molekylvridningen ($H8x_\alpha$ nederst og $H10_\beta$ øverst). Fylte sirkler viser de DFT-bregnede prinsipalverdiene ved ulike torsjonsvinkler. Stiplede linjer angir eksperimentelle verdier. Åpne trekanter viser DFT-beregnet isotropverdi, røde linjer angir eksperimentell isotropverdi. Dihedralvinkelen $H_\beta-N_\beta-C_\alpha-P_z$ minker fra 171° (0° rotasjon om C8-N5), til 121° (50° rotasjon).

Figur 5.6 viser at β -koblingen beskrives best når torsjonsvinklene endres i overkant av 40° , dette stemmer med det beregnede avviket på 43° fra eksperimentelle data. For α -koblingen, som klart er mindre følsom for en slik variasjon i geometri, er det et rimelig

samsvar med hensyn på prinspalverdier for alle vinkler. I isolerte NFG har K1 en tilsvarende dihedralkvinkel på ca 90°. Dette tilsvarer en rotasjon om C8-N5 på omkring 80°. DFT-beregninger for K1 i isolert *N*-formylglysin (tabell 4.4) viste en α -kobling med isotropverdi på -42.5 MHz og en kobling med isotropverdi på -8.7 MHz. Disse verdiene kan sies å være i rimelig samsvar med trenden i figur 5.6.

K2-beregninger

For K2 ble et hydrogenatom addert til O5 med standard bindingsavstand og vinkel. Alle torsjonsvinkelene måtte fryses for at beregningene skulle la seg gjennomføre uten stans i geometri-optimaliseringen.

Tabell 5.5: DFT-beregninger med ett av de to mulige radikalene, K2, i aminosyredelen av komplekskrystallen C:NFG. Beregningene er gjort uten hensyn til cytosindelen. Alle torsjonsvinkler er holdt konstant. Egenvektorene er angitt i et internt system $\langle xyz \rangle$. Retninger for den optimaliserte strukturen som er gitt nederst i tabellen er angitt i dette systemet.

Tensor	Isotrop verdi (MHz)	Anisotrope verdier (MHz)	Prinspalverdier (MHz)	Egenvektorer		
				$\langle x \rangle$	$\langle y \rangle$	$\langle z \rangle$
H9	-56.505	-33.774	-90.279	0.3978	0.8020	0.4456
		5.965	-50.540	0.3103	-0.5747	0.7573
		27.808	-28.697	0.8634	-0.1630	-0.4774
K2 H10	-17.868	-14.580	-32.448	0.8934	0.3034	-0.3314
		-4.933	-22.801	-0.4488	0.6351	-0.6286
		19.513	-37.381	0.0197	0.7103	0.7036
N5	6.814	-12.525	-5.711	-0.2792	0.6118	0.7401
		-12.082	-5.268	0.8642	0.4960	-0.0840
		24.608	31.422	0.4185	-0.6162	0.6672
Retninger for den optimaliserte strukturen til K2:						
C9-H9				-0.8112	0.0689	0.5806
N5-H10				-0.0991	0.7119	0.6953
C9---H10				0.4783	0.7756	0.4118
normal til planet H9-C9-O5				0.4326	-0.5974	0.6753

I følge DFT-beregningene (tabell 5.5) har K2 en α -type kobling mellom C9 og H9.

Denne ligner tensor 1 med hensyn til både isotrope og anisotrope verdier. Isotropverdien gir en p_z -spinnitetthet på C9 på 0.78 ved McConnells relasjon.

Tensor 2 har lite til felles med den beregnede H10-koblingen for K2 i tabell 5.5. H10 viser alt for stor anisotropi og den isotrope verdien avviker mye i absoluttverdi og har motsatt fortegn av det tensor 2 antas å ha. DFT-beregningene gir H10-koblingen en form

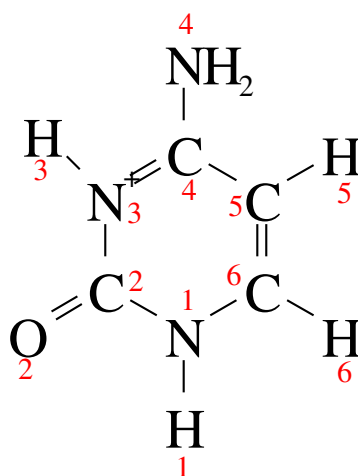
som en N-H_α kobling og en p_z-spinnitetthet på hele 0.22 på nitrogenatomet. Den beregnede nitrogenkoblingen (N5) i K2 er mye større enn det som kan observeres i spektrene og viser en anisotropi som ikke er observert eksperimentelt. DFT-beregninger av hyperfinkoblinger svekker K2 som radikalkandidat.

Oppsummering glysinradikalet

De eksperimentelle resultater og teoretiske beregninger gitt i dette kapitlet viser at i likhet med isolert *N*-formylglysin ser det ut til at sentralresonansens hovedtrekk (figur 5.2) har sitt opphav i et radikal som best kan beskrives ved hjelp av K1. Det innebærer at det har vært en netto hydrogenabstraksjon fra C8, som vist i figur 5.5. Resultatene tyder også på at radikaldannelsen fører til en rotasjon om C8-N5-bindingen på omkring 40°.

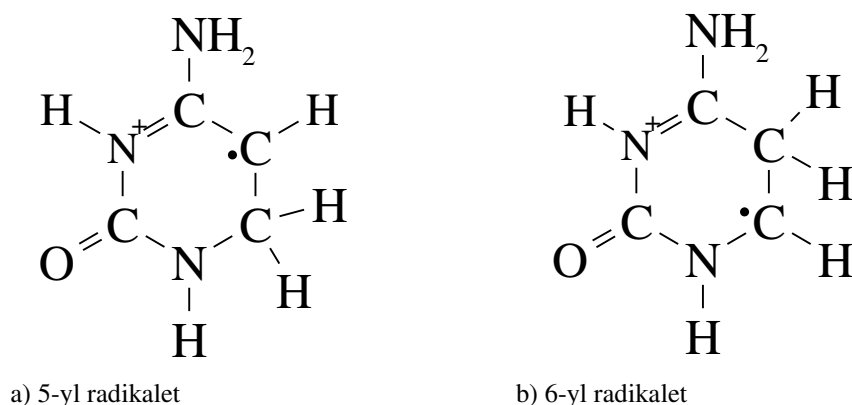
5.3 Cytosinradikaler

I tillegg til radikaldannelse i *N*-formylglysin-delen av komplekset, dannes det trolig også radikaler i cytosindelen som gir opphav til de svake resonanslinjene på yttersidene av sentralresonansen i ESR-spektrene vist i figur 5.1 og figur 5.2. En rekke cytosinderivater er tidligere undersøkt og mange ulike radikaler er beskrevet. I og med at cytosindelen av komplekskrystallen er protonert på N3, kan det være mest nærliggende å sammenligne med N3-protonerte cytosinderivater, som cytosin·HCl (15, 53), 3'CMP (51), 5'dCMP (50, 53, 54) og CdR·HCl (55). En standard nummerering av ring-atomene i cytosinmolekylet er gitt i figur 5.7.



Figur 5.7: Standard nummerering av ringatomene i et N3-protonert cytosinmolekyl.

Linjene som kan ses på hver side av sentralresonansen i ESR-spektrene av cytosin:*N*-formylglysin (figur 5.1 og figur 5.2) har en total spektralbredde ved akseorienteringer på 250-340 MHz. Dette er bredder som er karakteristisk for de kjente cytosinradikalene 5-yl og 6-yl (5,6-dihydrocytosin-5-yl og 5,6-dihydrocytosin-6-yl) som er vist i figur 5.8. I alle de tidligere nevnte undersøkelser av cytosin og cytosinderivater er ett eller begge disse radikalene observert og beskrevet.



Figur 5.8: H-addisjonsradikaler dannet i bestrålt cytosin. a) 5-yl radikalet og b) 6-yl radikalet.

5-yl radikalet

5-yl radikalet i cytosin dannes ved netto hydrogenaddisjon til C6 og karakteriseres ved en vekselvirkning mellom uparet spinn på C5 og et α -proton (HC5) samt to β -protoner på C6. Hole *et al.* (15) har i lavtemperaturstudier av cytosin-HCl funnet 5-yl radikalets C5-H α -kobling med en isotrop verdi på omkring -51 MHz og prinsipalverdier som gitt i tabell 5.6. Tilsvarende undersøkelser av cytosin monohydrat (14) viser koblingsverdier av samme størrelse. Det samme gjør romtemperaturstudiene av cytosin-HCl til Westhof *et al.* (13) og Huuse (53). Bernhards gjennomgang (20) av flere cytosinderivater viser en gjennomsnittlig isotropverdi på -48 MHz.

Tabell 5.6: Hyperfinkoblingsstørrelser (i MHz) for C5-H α -koblinger i 5-yl radikalet funnet i ulike cytosinderivater. Tallene i parentes angir usikkerheten i siste siffer.

Forbindelse	Isotropverdi	Prinsipalverdier			ref.
Cytosin monohydrat	-51.8 (2)	-80.0 (1)	-51.8 (3)	-23.5 (4)	(14)
Cytosin-HCl	-50.8 (3)	-77.3 (4)	-51.8 (4)	-23.4 (5)	(15)

De to β -koblingene i 5-yl radikalet gir vanligvis et bidrag på til sammen omkring 280 MHz. I følge Flossman *et al.* (56) er disse β -koblingene nesten like store (omkring 137 og 148 MHz) i cytosin monohydrat. I cytosin-HCl har Hole *et al.* (15) funnet to β -koblinger hvor isotropverdiene er anslått til å være omkring 139 og 147 MHz. Disse koblingene er relativt isotrope, med variasjoner på ± 6 MHz fra isotropverdiene.

Huuse (53) har funnet en N3-H α -kobling i 5-yl radikalet med prinspalverdier på -11.3, -8.3 og -0.2 MHz. Maksimalverdien ligger i planet, normalt på NH-retningen. Denne koblingen er også registrert av Krivokapić (57). Krivokapić har for 5-yl i cytosin-HCl (dopet med 5-metylcytosin-HCl) i tillegg registrert to N4-H α -koblinger som tilhører NH₂-gruppen i 5-yl, med isotropverdier på -10.4 og -11.6 MHz. Disse er også funnet av Huuse (53), men er da antatt å tilhøre et annet radikal. En kobling som er nesten identisk med den tensoren som har en isotropverdi på -11.6 MHz er også funnet i 5-yl av Hole *et al.* (15), men er da antatt å skyldes N3-H. Det samme gjelder for CdR-HCl (55).

6-yl radikalet

Et 6-yl radikal i cytosin dannes ved en netto hydrogenaddisjon til C5. Spinnet lokalisert til C6 vil vekselvirke med et α -proton på C6 og to tilnærmet ekvivalente β -protoner på C5. 6-yl radikalet i cytosin-HCl (15) og cytosin monohydrat (14) har, som for 5-yl, relativt like verdier for α -koblingen (tabell 5.7). Bernhard (20) viser at i de fleste undersøkelser er isotropverdien til α -koblingen i 6-yl omkring -50 MHz

Tabell 5.7: Hyperfinkoblingsstørrelser (i MHz) for C6-H α -koblinger i 6-yl radikalet funnet i ulike cytosinderivater. Tallene i parentes angir usikkerheten i siste siffer.

Forbindelse	Isotropverdi	Prinspalverdier			ref.
Cytosin monohydrat	-52.4 (2)	-84.0 (4)	-50.9 (4)	-22.2 (3)	(14)
Cytosin-HCl	-55.6 (2)	-88.2 (3)	-52.8 (3)	-25.8 (4)	(15)

Flossman *et al.* (56) har funnet to ekvivalente og isotrope β -koblinger (hver på 104 MHz) i cytosin monohydrat. Bernhards gjennomgang (20) viser at det totale bidraget fra β -koblingene i cytosinets 6-yl radikal gjerne er rundt 200 MHz, altså et noe mindre bidrag enn 5-yl. 6-yl radikalet er ikke alltid observert ved romtemperatur i cytosin-HCl. Hole *et*

al. (15) har registrert β -koblinger med isotropverdier på 143.5 og 48.3 MHz etter oppvarming til romtemperatur. De anisotrope bidragene er opptil en størrelsesorden på 10 MHz. Eksperimentene til Flossman *et al.* (56) viser at spinn tetthet på N1 gir opphav til en stor og anisotrop linjebredde for 6-yl.

5.4 Simuleringer

Det er grunn til å anta at dersom radikalene 5-yl og 6-yl dannes i cytosindelen av cytosin:*N*-formylglysin vil de vise koblinger av samme størrelsesorden som i de refererte arbeidene. I 6-yl radikalet forventes en maksimal triplettsplitting på grunn av spinn tetthet på N1 når magnetfeltet er i ringplanet. Dette øker linjebredden, og dermed svekkes ESR-signalet ved slike orienteringer. Det forventes ingen ekstra splitting når feltet er parallelt med ringnormalen. I 5-yl vil en nitrogenkobling forventes å være maksimal, og gi svakest signal, når magnetfeltet er rettet langs ringnormalen. Den samme koblingen er minimal når magnetfeltet er i planet og gir da sterkere signal (56). I cytosin:*N*-formylglysin ligger $\langle b \rangle$ i cytosinplanet, mens ringnormalen er mellom $\langle a \rangle$ og $\langle c \rangle$. Det antas derfor at 5-yl radikalet vises best når $B \parallel \langle b \rangle$ og at ved orienteringene $B \parallel \langle a \rangle$ og $B \parallel \langle c \rangle$ vil 6-yl være tydeligere. Radikalet 5-yl har større β -koblinger enn 6-yl, og figur 5.2 viser at spektralbredden er størst for $B \parallel \langle b \rangle$ hvor 5-yl forventes observert.

Det er har ikke vært mulig å beregne noen hyperfinkoblingstensorer med utgangspunkt i de svake linjene som trolig representerer 5-yl og 6-yl i ESR-spektrene (figur 5.2). Ved hjelp av simuleringer av aksespektre er det imidlertid mulig å gi et estimat av koblingenes størrelser. Simuleringer gjennomført ved hjelp av *kvasat* viser at de eksperimentelle spektrene i store trekk kan gjenskapes ved å anta at cytosinradikalene 5-yl og 6-yl er tilstede i komplekskrystallen sammen med glysinradikalet (K1). I tillegg har det vist seg å være nødvendig å legge til en bred singlett. Dette fenomenet er tidligere observert i cytosin monohydrat (58), og singletten skyldes derfor etter all sannsynlighet en rekke uoppløste cytosinradikaler.

Utgangspunktet for simuleringene var de eksperimentelle resultatene for glysin-resonansen samt data fra de tidligere observerte cytosinradikaler i cytosinderivater. Etter enkelte justeringer i de publiserte data ble det til en viss grad mulig å gjenskape

aksespektrene, se figur 5.9-5.11. I appendiks B er simuleringsfilen for B || $\langle a \rangle$ vist. Magnetfelt og koblinger er gitt i gauss (1 gauss = 2.8 MHz).

Glysinradikalet kan simuleres ved bruk av en noe justert utgave av tensorene 1 og 2 samt nitrogenkoblingen (tabell 5.2). De små endringene er på opptil 1 gauss, og begrunnes med at tensorberegningene er gjort ut fra ESR-spektre som er noe usikre. Benyttet linjebredde er 12 MHz. Glysinresonansen utgjør hovedlinjene i de simulerte spektrene.

Resonansen fra 5-yl radikalet er gjenspekt med en α -kobling med prinspalverdier gitt i tabell 5.6 som utgangspunkt, samt to relativt like og isotrope β -koblinger med akseverdier i underkant av 130 MHz. Disse β -koblingene er bestemt med utgangspunkt i et eksperimentelt spekter med B || $\langle b \rangle$, som er eneste orientering hvor det er et vesentlig bidrag fra 5-yl. For de andre orienteringene er bidraget fra 5-yl så lite at det ikke er mulig å angi noen eksakte verdier for koblingsstørrelsene. I tillegg til α - og β -koblingene er det lagt inn noen flere koblinger. En N3-H3-kobling med maksimalverdien som det eneste bidraget er benyttet, samt en mindre nitrogenkobling med bidrag kun langs plannormalen. Ingen av disse to koblingene gir imidlertid synlige bidrag til 5-yl-spekteret. En ekstra splitting med eneste (maksimale) bidrag langs $\langle b \rangle$ måtte også til for å gjenskape spekteret. Denne splittingen kan tenkes å skyldes spinntetthet på N4 som vekselvirker med H41 eller H42 (figur 3.6). NH₂-gruppen ligger i cytosinplanet, og retningen N4-H42 (forventet minimalretning) er rettet normalt på $\langle b \rangle$, som også ligger i cytosinplanet. Plannormalen (forventet intermediærretning) er også rettet normalt på $\langle b \rangle$. Derfor kan maksimalretningen være rettet langs $\langle b \rangle$, hvilket indikerer at det er N4-H42 som gir opphav til den lille ekstra splittingen. N4-H41 har en annen retning, ikke langt fra $\langle b \rangle$, og kan ikke gi opphav til en kobling med maksimalverdi langs $\langle b \rangle$. For de andre akseorienteringene er bidraget fra 5-yl så lite at det ikke er mulig å avgjøre om det opptrer noen ekstra splitting. Derfor er det heller ikke mulig å avgjøre om koblingens verdi langs $\langle b \rangle$ virkelig er en maksimalverdi. Linjebredden til 5-yl er satt til omkring 6 MHz i simuleringene.

For 6-yl radikalet bidrar α -koblingen C6-H6 med prinspalverdier som i utgangspunktet er hentet fra tabell 5.7. De to β -koblingene har fått akseverdier på omkring 64 og 126 MHz, slik at totalbredden som forventet blir nesten 200 MHz. En liten nitrogen-

kobling (N1) er også lagt til, med bidrag kun i cytosinplanet. Linjebredden er satt til i nærmere 9 MHz.

Singletten, som viser seg å bidra mye til spekteret, har en gjennomsnittlig linjebredde på aksene på hele 42 MHz, og *g*-verdien langs aksene er 2.0038-2.0050.

Mengdeforholdet mellom de fire bidragene varierer fra orientering til orientering (tabell 5.8). Generelt viser simuleringene at 5-yl og 6-yl bidrar lite til spektrene, totalbidraget er trolig omkring 5-10 %. Andelsbestemmelse ved hjelp av regresjonsanalyse er gjort ved hjelp av *Microsoft Excel*. Størrelsen R^2 gir et mål på korrelasjonen mellom simulerte og eksperimentelle spektrere. En sammenligning av de vektete spektrere og de eksperimentelle spektrere viser tydelig at regresjonsanalysen underestimerer bidragene fra 5-yl og 6-yl. For å oppnå bedre visuell overensstemmelse (figur 5.9-5.11) er mengden 5-yl og 6-yl økt for alle orienteringene. Dette gir en liten endring i totalmengde og følgelig noe lavere andeler for alle radikalene enn det som er angitt i tabell 5.8. Som forventet er 5-yl mest tydelig ved $\langle b \rangle$, mens 6-yl bidrar mest ved $\langle a \rangle$.

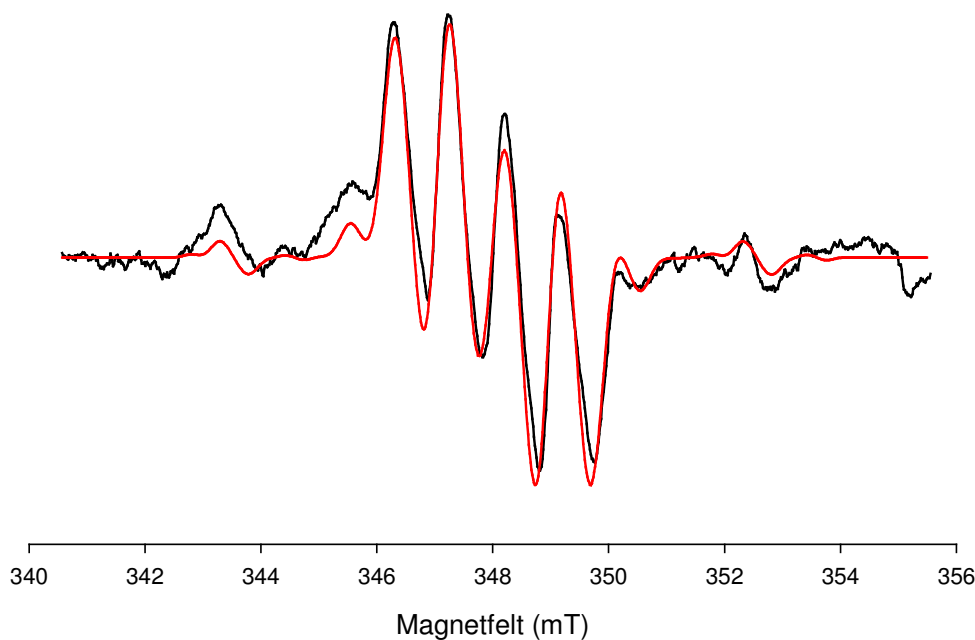
Tabell 5.8: Resultater fra simuleringer av komplekskrystallens aksespektrere. Andeler er beregnet ved regresjon. Verdier for andeler av 5-yl og 6-yl benyttet i figur 5.9-5.11 er gitt i parentes. Dermed øker totalmengden og andeler for alle radikalene reduseres. Aksespektrere er tatt opp for hver av de krystallografiske aksene ved rotasjon i to plan. Øverste rad for hver orientering tilhører spektrere som er vist i figur 5.9-5.11.

Akse	Andeler				R^2	Dose (kGy)
	Glysin (K1)	5-yl	6-yl	singlett		
$\langle a \rangle$	0.59	0.003 (0.005)	0.05 (0.06)	0.35	0.92	52
	0.55	0.009	0.05	0.40	0.94	104
$\langle b \rangle$	0.28	0.03 (0.05)	0.06 (0.08)	0.62	0.90	52+70
	0.31	0.05	0.05	0.60	0.85	52
$\langle c \rangle$	0.48	0.001 (0.002)	0.01 (0.05)	0.51	0.92	52+70
	0.45	0.003	0.02	0.53	0.91	104

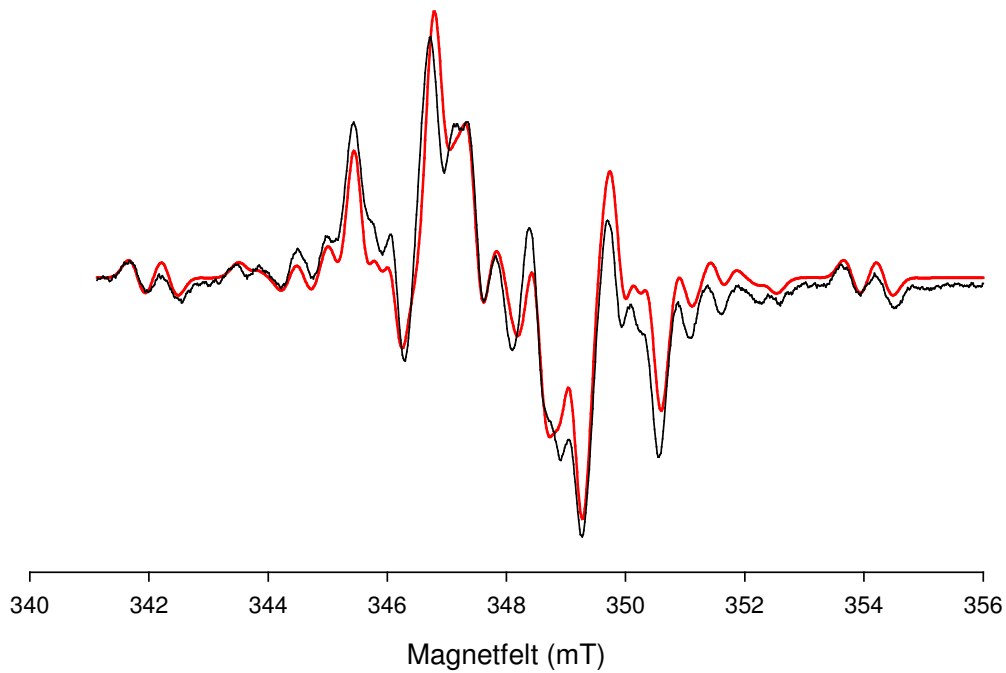
Aksespektrere er tatt opp etter ulike stråledoser til krystallene (tabell 5.8). Glysinradikalet bidrar mye mer enn singletten når magnetfeltet er rettet langs $\langle a \rangle$. Med $B \parallel \langle b \rangle$ dominerer singletten, og langs $\langle c \rangle$ er de to komponentene omtrent like store. Dette er doseuavhengig. Dermed viser det seg at det ikke er mulig å bruke ESR-spektrere fra

enkrystaller til å si noe om fordeling av radikalmengder i komplekset. Pulverspektre egner seg bedre til dette, men er ikke undersøkt i dette arbeidet. Bidragene fra både 5-yl og 6-yl vises best i det eksperimentelle spekteret for $B \parallel \langle b \rangle$. Det betyr at denne orienteringen gir den beste muligheten for å finne korrekte simuleringsdata for disse to koblingene, slik at bidragene i sentralresonansen fra 5-yl og 6-yl vil bli mest riktig. Selv om R^2 -verdien ikke er spesielt god, kan denne orienteringen trolig best gi et svar på forholdet mellom glysinradikalet og singletten. I så fall betyr det at det dannes omkring dobbelt så mye av singletten som av glysinradikalet.

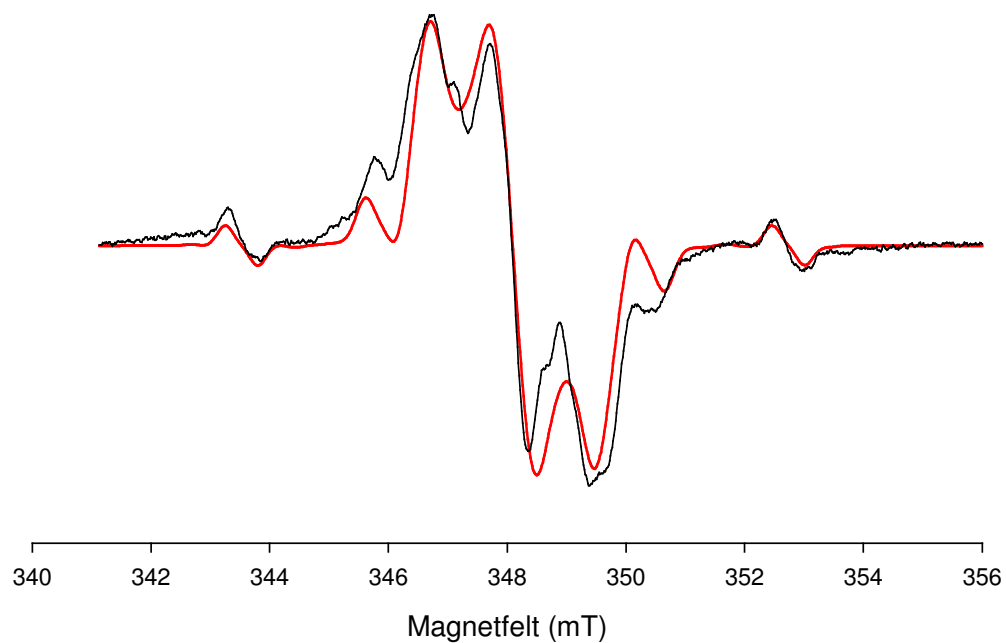
Det er ikke mulig å få full overensstemmelse ($R^2 = 1.0$) mellom simuleringer og eksperimentelle spektrere. Dette skyldes først og fremst støy og at ESR-spektrere er svært komplekse. De eksperimentelle data for glysinradikalet er usikre ettersom de er basert på ESR-data og ikke ENDOR-resultater. Det foreligger heller ikke noen fullstendige eksperimentelle data for cytosinradikalene i komplekset, og simuleringene må derfor baseres på data fra andre cytosinderivater. En del koblingsstørrelser er derfor endret etter prøving og feiling, men andre kombinasjoner kan kanskje også gjenskape spektrere. Det foreligger heller ingen god beskrivelse av singletten, annet enn at den trolig skyldes cytosinradikaler (58) og viser seg å bidra betydelig til enkelte cytosinspektrere.



Figur 5.9: Eksperimentelt (sort) og simulert (rød) førstederivert ESR-spekter av cytosin:*N*-formylglysin, magnetfeltet parallelt med $\langle a \rangle$. R^2 -verdien for tilpasningen var 0.92, men andel 5-yl og 6-yl er noe økt i figuren (uten reduksjon i de andre andelene (tabell 5.8)).



Figur 5.10: Eksperimentelt (sort) og simulert (rød) førstederivert ESR-spekter av cytosin:*N*-formylglysin, magnetfeltet parallelt med $\langle b \rangle$. R^2 -verdien for tilpasningen var 0.90, men andel 5-yl og 6-yl er økt i figuren (uten reduksjon i de andre andelene (tabell 5.8)).



Figur 5.11: Eksperimentelt (sort) og simulert (rød) førstederivert ESR-spekter av cytosin:*N*-formylglysin, magnetfeltet parallelt med $\langle c \rangle$. R^2 -verdien for tilpasningen var 0.92, men andel 5-yl og 6-yl er økt i figuren (uten reduksjon i de andre andelene (tabell 5.8)).

6 Oppsummering og diskusjon

Primære strålingsskader i molekyler utgjøres i hovedsak av ioner (anioner og kationer) som dannes etter løsrivning av elektroner. Disse radikalene kan nøytraliseres (og stabiliseres) ved protonerings- og deprotoneringsreaksjoner. Videre vil disse produktene inngå i sekundære prosesser hvor protoner og hydrogenatomer frigis og forårsaker dannelse av sekundære radikaler. De radikaler som observeres ved romtemperatur er produkter dannet etter en rekke slike sekundærreaksjoner. Sekundære radikaler kan generelt ikke gi svar på hvilke radikaler som er dannet rett etter bestrålingen eller hvordan reaksjonsforløpet, som ender med de stabile radikalene, har vært. Romtemperaturstudier alene egner seg derfor dårlig til å beskrive radikalenes dannelsesmekanismer.

6.1 Glysinradikal

Resultatene fra det foreliggende arbeidet viser at det mest sannsynlig er glysinradikalet K1 (figur 4.13a og figur 5.5a) som observeres både i N-formylglysin og i cytosin:N-formylglysin. Ved romtemperaturstudier ses bare de radikaler som er stabile ved denne temperaturen. Disse produktene er dannet etter en rekke sekundærreaksjoner. Bare ett glysinradikal observeres i de nevnte krystallene ved romtemperatur. Forløperne til dette radikalet er forsvunnet. Som nevnt i kapittel 4 er det tidligere gjort mange undersøkelser av glysin og glysinderivater. ESR-spektre av N-formylglysin kan ikke uten videre sammenlignes med glysin, først og fremst på grunn av vekselvirkninger med NH_3 -gruppen i glysin. Likevel er det naturlig å se nærmere på hvilke radikaler som dannes i glysin.

I glysin ($\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COO}^-$) bestrålt ved romtemperatur opptrer flere radikaler. I 1964 beskrev Morton (43) radikalene $\text{NH}_3^+\text{C}^*\text{HCOO}^-$ (A) og $\text{C}^*\text{H}_2\text{COO}^-$ (B). Brustolon *et al.* (44) detekterte i 1997 et nytt radikal ved romtemperatur, $\text{C}^*\text{H}_2\text{NH}_2$ (C), og fastslo at radikalene A og C er stabile i måneder mens B forsvinner i løpet av noen uker. Sanderud og Sagstuen (45) har senere observert den samme resonansen som i radikal C men konkluderer med en noe annen radikalstruktur, $\text{NH}_2\text{C}^*\text{HCOOH}$. Etter bestråling ved lavere temperaturer ses flere andre radikaler, men det er først og fremst romtemperaturradikalene som er relevante for sammenligning med de foreliggende NFG-resultatene.

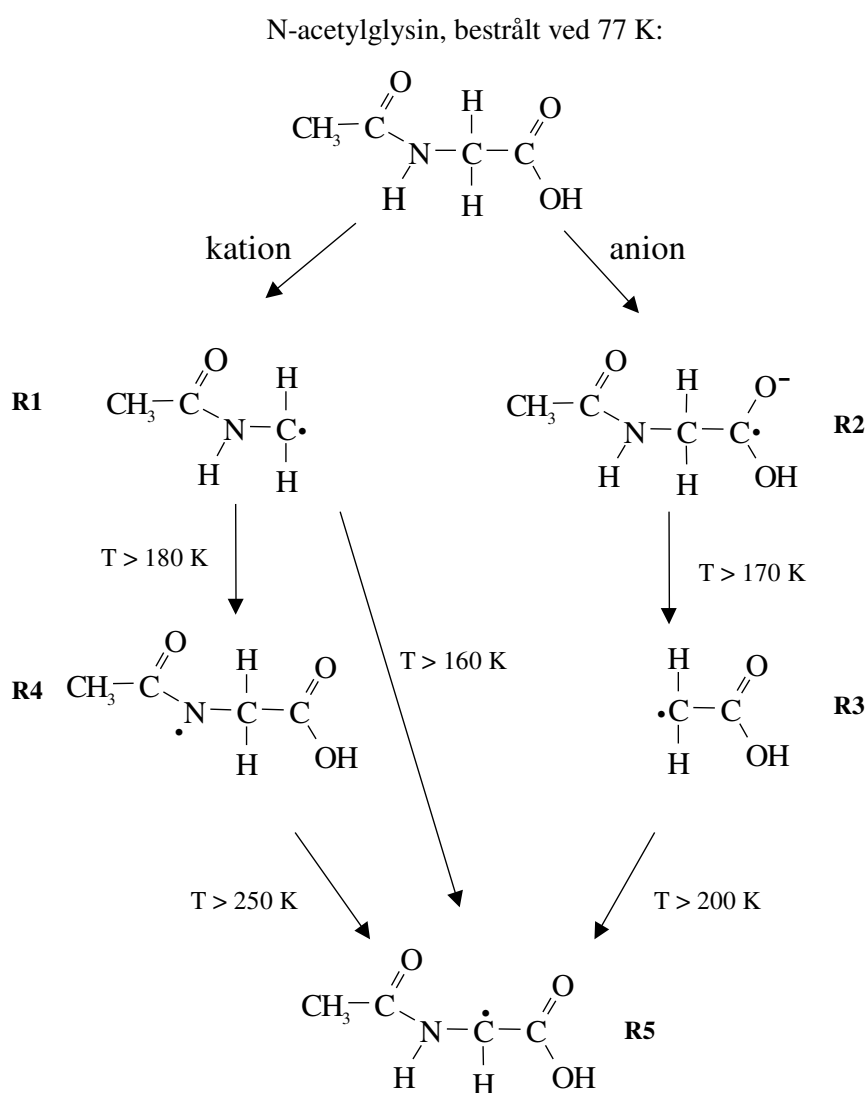
N-acetylglysin (NAG), $(\text{CH}_3\text{CO})\text{NHCH}_2\text{COOH}$, er mer direkte sammenlignbar med N-formylglysin. NFG og NAG er noen av de enkleste forbindelsene som inneholder en peptidbinding. NAG har, i motsetning til NFG, blitt undersøkt av flere og har vært av særlig interesse siden romtemperaturredikaleet viser en dublett lik bestrålte proteiner (49). Miyagawa *et al.* (46) undersøkte bestrålte enkrystaller av NAG ved romtemperatur. Aksespektrene viser en enkel dublett. Deuterte krystaller viser samme resonans og det gir grunn til å anta at dubletten skyldes ett av protonene i CH_2 -fragmentet. Dette radikalet, $(\text{CH}_3\text{CO})\text{NHC}^*\text{HCOOH}$, er en analog til K1 som antas dannet i N-formylglysin, både isolert og i komplekset. Det uparede elektronet, som antas å være et π -elektron, forventes å vekselvirke med nitrogenatomets "lone pair". En slik vekselvirkning er imidlertid ikke observert og antas å være en av årsakene til absorpsjonslinjens forbredding. Andre årsaker til linjeforbredninger er svake vekselvirkninger med NH-protonet. Saxebøl *et al.* (59) fant senere at dublettlinjene fra elektronbestrålt NAG var splittet opp i sekstetter. Deuterte krystaller ga en mye bedre oppløsning, men ingen endring i radikalstruktur. Den oppløste splittingen skyldes metyl-protonene og nitrogenatomet. Metylsplittingen viser at det er uparet spinntetthet også på protoner i δ -posisjon fra det karbonatomet hvor spinntettheten ble antatt å være lokalisert. Dette betyr at det uparede elektronet kan delokaliseres over peptidbindingen. Nitrogensplittingen antas å være noe anisotrop med verdier på 7-9 MHz, mens N-H-splittingen er ikke observert (uoppløst). Ved lavtemperatur opptrer flere radikaler i N-acetylglysin med $\text{CH}_3\text{CONHC}^*\text{H}_2$ som det dominerende produkt ved 77 K. Også ENDOR-undersøkelser (60) av NAG viser at $(\text{CH}_3\text{CO})\text{NHC}^*\text{HCOOH}$ er det stabile radikalet i romtemperatur. Undersøkelser av N-acetylaminosyrer (61) viser at alle slike, bortsett fra NAG, har det dekarboksylerte radikalet som dominerende. For NAG er det, som beskrevet ovenfor, hydrogenabstraksjonsradikalet som dominerer.

Glycylglysin er også sammenlignbart med NFG. Katayama og Gordy (47) fant ett radikal (både ved romtemperatur og ved 77 K) hvor det har vært en netto hydrogenabstraksjon fra CH_2 -fragmentet som er bundet til karboksylgruppen. Heller ikke her er det detektert noen struktur fra det nitrogenbundne hydrogenatomet. Linjeforbredningen som observeres antas i hovedsak å skyldes uoppløst nitrogensplitting, med en spinntetthet på nitrogenet på mindre enn 0.05.

Sammenligninger med ESR-undersøkelser av glysinderivater gir grunnlag for å forvente å finne hydrogenabstraksjonsradikalet K1 i bestrålt N-formylglysin (isolert eller i kompleks) ved romtemperatur. En svak kobling til hydrogenatomet i formylgruppen kan muligens forventes dersom noe spinntetthet "lekker" gjennom peptidbindingen. Med god oppløsning kan det også være mulig å observere det nitrogenbundne hydrogenatomet og triplett-splitting fra nitrogenatomet.

For begge krystallene studert i dette arbeidet er det beregnet to hyperfinkoblingstensorer, og resultatene gir grunnlag for å anta at radikalet som er dannet, både isolert N-formylglysin og i N-formylglysin-delen av komplekskrystallen, er glysinradikalet K1. Begge krystallene har en tensor som kan tolkes som en C-H α -kobling som skyldes netto hydrogenabstraksjon fra CH₂-fragmentet. Tolkningen av den minste koblingen (tensor 2) er mer usikker. I isolert NFG er det ingen klare indikasjoner på hva som forårsaker denne koblingen. Det kan være en vekselvirkning med hydrogenatomet som er bundet til nitrogenatomet, da enten som en C---H β -kobling eller en N-H α -kobling. Koblingen kan også ha sitt opphav i hydrogenatomet i formyldelen. Ingen av disse tre alternativene skiller seg klart ut, og dette kan bare avklares ved å studere deutrerete krystaller. Det ble imidlertid observert en kobling i N-acetylglysin som knyttes til metylgruppen, samtidig som det ikke ble registrert noen N-H α -kobling. Dette kan indikere at det burde være større muligheter for å observere H31 fra formylgruppen enn det nitrogenbundne H1 i isolert NFG. I komplekskrystallen er det et internt samsvar mellom krystallografiske retninger og prinsipalretninger som favoriserer en C---H β -kobling som opphav til den minste koblingen i sentralresonansen. De to krystallene kan ha ulik spinntetthetsfordeling og dermed ulike årsaker til de observerte koblingene. Forskjellen i spinntettheter kan begrunnes med at NFG-molekylet i de to tilfellene ikke har samme omgivelser. I komplekskrystallen er hvert NFG-molekyl forbundet med cytosinmolekyler via hydrogenbindinger. Dessuten er molekylet vridd på midten i komplekset i forhold til det plane molekylet i isolert N-formylglysin. Dette gir opphav til andre egenskaper og muligheter. I cytosin:N-formylglysin observeres en triplett-splitting som skyldes spinntetthet på nitrogenatomet i glysindelen. I isolert N-formylglysin er det ikke registrert noen så tydelig spinntetthet på nitrogenet, trolig i hovedsak på grunn av dårlig oppløsning i spektrene.

Mekanismer for radikaldannelse er i mange år studert i glysinderivater spesielt og i aminosyrer generelt. Siden det ikke er gjort lavtemperaturundersøkelser med N-formylglysin vil ikke de foreliggende resultatene kunne kaste nytt lys over dannelsesmekanismene. Det er nærliggende å tro at radikaldannelsesforløpet er av samme type som for NAG eller andre glysinderivater. Henriksen *et al.* (62) har presentert en oversikt (figur 6.1) for de intra- og inter-molekylære prosesser (anion/kation-dannelse, deprotonering, dekarboksylering og deaminering) som NAG gjennomgår, og de radikaler som oppstår ved oppvarming fra 77 K til romtemperatur. Acetylgruppen inngår ikke i disse prosessene, men trolig er situasjonen den samme for formylgruppen i NFG.



Figur 6.1: Oppsummering av de ulike radikalerne som dannes i krystaller av N-acetylglysin etter bestråling ved 77 K og deretter oppvarming til romtemperatur, i følge Henriksen *et al.* (62). Det stabile romtemperaturradikalet (R5) er en analog til K1 som antas å være det observerte stabile radikalet i krystaller av N-formylglysin bestrålt ved romtemperatur.

Reaksjonsforløpene for både kationer og anioner (primære radikaler) i NAG ender opp med en netto hydrogenabstraksjon som det stabile romtemperaturradikalet (R5 i figur 6.1), som tilsvarer radikal K1 i N-formylglysin (figur 4.13a). Det er derfor i utgangspunktet ikke mulig å avgjøre hvilket av de to primærradikalene som er forløper for radikalet K1 i N-formylglysin. Det er heller ikke nødvendigvis de samme forløpene som dominerer i isolert NFG som i komplekskrystallen hvor det må tas hensyn til cytosinmolekylet.

6.2 Cytosinradikaler

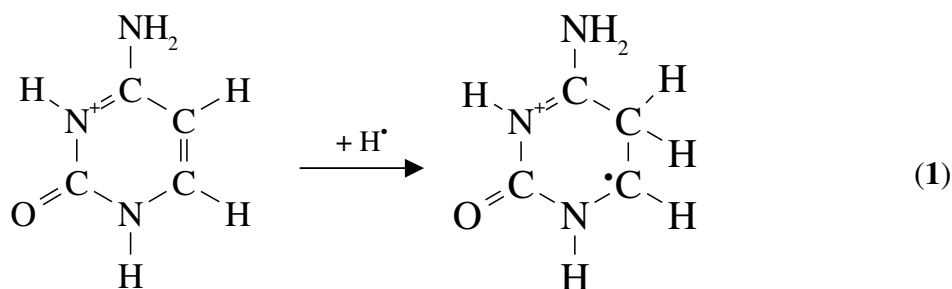
Det er relativt liten tvil om at sideresonansene fra komplekskrystallen representerer H-addisjonsradikalene 5-yl og 6-yl i cytosin. Disse radikalene er bare noen av de radikaler som vanligvis observeres i cytosin. I cytosin monohydrat er det ved romtemperatur også funnet addisjonsradikalene 2-hydroksy-6-yl (13), 6-hydroksy-5-yl og 6-oksy-5-yl (63), samt en singlett med ukjent opphav (58). Mengden av vannmolekyler i krystallene påvirker radikaldannelsen ved at mange vannmolekyler gir flere H[•] og OH[•] addisjonsradikaler ved indirekte effekt. Cytosin-HCl er i likhet med C:NFG protonert på N3. Ved romtemperatur har Huuse (53) observert 5-yl og 2-hydroksy-6-yl, muligens også det N1-deprotonerte kationet.

De foreliggende resultatene indikerer altså færre cytosinradikaler enn det man kunne forvente. Dette kan skyldes at bare 5-yl og 6-yl har resonanslinjer som opptrer utenfor sentralresonansen hvor glysinradikalet dominerer. Andre cytosinradikaler kan være skjult under den dominerende sentralresonansen. Simuleringene viser også at en bred singlett bidrar sterkt til de sentrale deler av spekteret. Ettersom dette fenomenet også er observert av Malinen i cytosin monohydrat (58), samtidig som isolert N-formylglysin ikke gir slike ESR-spektre, er det grunnlag for å anta at singletten har sitt opphav i cytosindelen av molekylet.

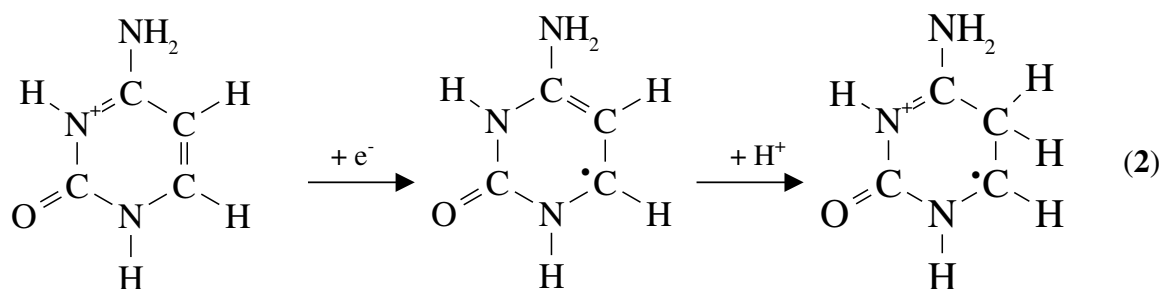
Heller ikke for cytosin kan kunnskapen om generelle dannelsesmekanismer økes på bakgrunn av de foreliggende data. De primære strålingsinduserte radikalene i cytosin er kationer og anioner. Det er foreslått flere mekanismer for dannelse av 5-yl og 6-yl ut fra disse primære radikalene.

6-yl radikalet

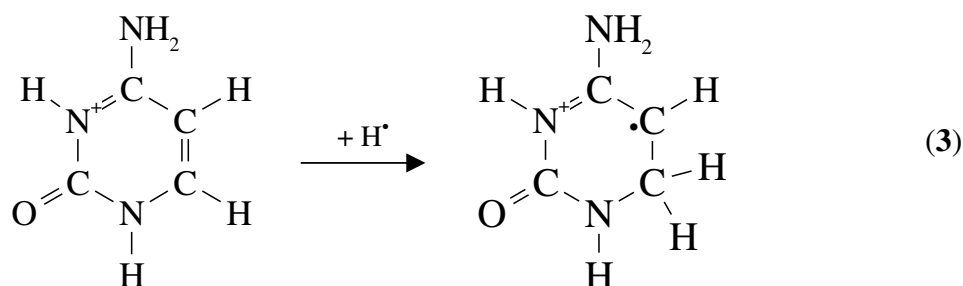
Det er flere mulige veier for dannelsen av 6-yl radikalet i cytosin. Bernhard (20) har konkludert med at frie hydrogenatomer i hovedsak adderes til C5 (og ikke C6). Disse hydrogenatomene kan være frigjort ved homolytiske bindingsbrudd etter eksitasjoner (kapittel 1). I forbindelse med hydrogenaddisjonen blir dobbeltbindingen mellom C5 og C6 brutt og et uparet spinn lokaliseres til C6 som i forløp 1:



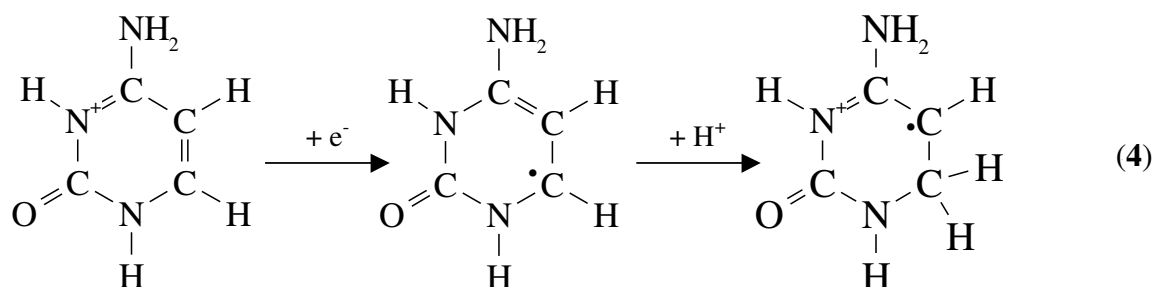
Videre har Bernhard argumentert for at 6-yl radikalet også kan dannes etter protonering av det strålingsinduserte cytosinanionet som i forløp 2:

**5-yl radikalet**

På samme måte kan 5-yl dannes ved hydrogenaddisjon til C6 (forløp 3), selv om dette antas å forekomme sjeldnere enn addisjon til C5 (20):



Det er kanskje mer sannsynlig at 5-yl dannes etter protonering av (det protonerte) anionet (forløp 4), dette skjer i følge Westhof *et al.* (13) oftere på C6 enn på C5:



6-yl radikalet er ikke observert i cytosin-HCl etter bestråling ved romtemperatur (53, 57), det antas at addisjon heller skjer ved C6 ved slike temperaturer. Westhof *et al.* (13) konkluderer med at H-addisjonsradikaler opptrer på ulike posisjoner avhengig av molekylets tilstand; 5-yl radikalet (C6-addisjonsradikalet) antas å skyldes protonering av anionet, mens 6-yl radikalet (C5-addisjonsradikalet) skyldes hydrogenering av det nøytrale (uskadde) molekylet. I tillegg til de skisserte forløpene er det mulig at både 5-yl og 6-yl radikalene kan dannes etter protonering av det uskadde molekylet med påfølgende elektroninnfangning.

Cytosinmolekylets omgivelser i komplekskrystallen er forskjellig fra omgivelsene i de andre cytosin-derivatene. Hydrogenbindingsmønsteret for cytosinmolekylene i komplekskrystallen er forskjellig fra situasjonen blant annet i cytosin monohydrat og cytosin·HCl. Dette innebærer muligheter for andre (dominerende) radikaler og mekanismer. Radikaldannelsen må ses i sammenheng med aminosyredelen av komplekskrystallen.

6.3 Spinnoverføring

Det har vært vist at det i γ -bestrålt deoksyribonukleoprotein (DNP) oppstår flere enkeltrådbrudd enn i bestrålt DNA (64), noe som betyr at nukleært DNA er mer sensitivt for ioniserende stråling enn isolert rent DNA. Dette ledet til en antakelse om at energi absorbert i proteindelen bidrar til trådbrudd i DNA. Det ble senere gjennomført en rekke undersøkelser av energioverføring mellom DNA og proteiner, blant annet ved hjelp av ESR-studier av histoner, DNA og kombinasjonene av disse i form av DNP eller kromatin

(fra kromosomer) (8, 9, 65-69). De tidligste studiene omtaler DNA-radikalet som et tyminradikal. Det ble lenge antatt at tymin er det eneste primære reduksjonsproduktet i bestrålt DNA. Senere er det vist at en del av den resonansen som har vært tilskrevet tymin snarere skyldes et protonert cytosinanion (70).

Allerede i 1961 viste Alexander *et al.* (8) ut fra ESR-spektre at bestråling av nukleoproteiner gav energioverføring fra proteindelen til DNA. I 1971 fant Lillicrap og Fielden (65) holdepunkter for overføring av eksitasjonsenergi fra histoner til DNA etter å ha undersøkt nukleohistoner med hensyn på strålingsindusert luminescens. Olast og Bertinchamps (66) viste i 1973 at i bestrålte komplekser av nukleotider og aminosyrer vil spinn ikke distribueres i henhold til strålingssensitivitet, men lokaliseres til DNA-komponentene. I 1987 rapporterte Cullis *et al.* (67) å ha funnet bevis for at når DNA er satt sammen med proteiner skjer en elektronoverføring fra histon til DNA. Bestrålt kromatin og bestrålte cellekjerner ble studert og ESR-spektrene fra disse ble sammenlignet med spektre fra separate komponenter (DNA og histoner). Også Faucitano *et al.* (68) fant i 1992 at radikalutbyttet i DNA er økt når DNA bestråles som kromatin (i kompleks med histoner). Spektre fra bestrålt mekanisk blanding av histoner og DNA, hvor molekylære vekselvirkninger er fraværende, ble vist ved simulering til å bestå av 10 % DNA-radikaler (cytosin- og tyminradikaler) og 90 % histonradikaler. Når DNA ble bestrålt som kompleks med histoner, økte DNA-bidraget til 48 %. Disse endringene i radikalutbytte ble sett på som et bevis for at innfangning av elektroner i tymin og cytosin er en nøkkel i spinnoverføringsmekanismen. Weiland og Hütterman (9) undersøkte i 2000 relativ radikaloverføring fra histoner til DNA i røntgenbestrålt kromatin, ved å analysere de relative ESR-bidragene fra de individuelle radikaler av proteiner og DNA. Kromatin inneholdt radikaler både fra DNA (oksidert guanin og redusert cytosin og tymin) og fra histondelen. Det ble vist at det relative utbyttet av de individuelle radikalene i kromatin skiller seg fra radikalutbyttet i histoner og DNA. Det totale radikalutbyttet av DNA-radikaler var omtrent dobbelt så stort i kromatinkomplekset som i rent DNA.

Det er ikke krystallstudier som ligger til grunn for disse antakelsene om overføring fra proteiner til DNA. Alle eksperimentene er gjort med DNA og andre komponenter hentet fra celler. Det er begrenset hvor godt et krystallsystem generelt, eller komplekskrystallen cytosin:N-formylglysin spesielt, er egnet for å beskrive prosesser i DNA-molekylet i levende celler. Ved å sammenligne relative intensiteter fra glysinradikalene og cytosin-

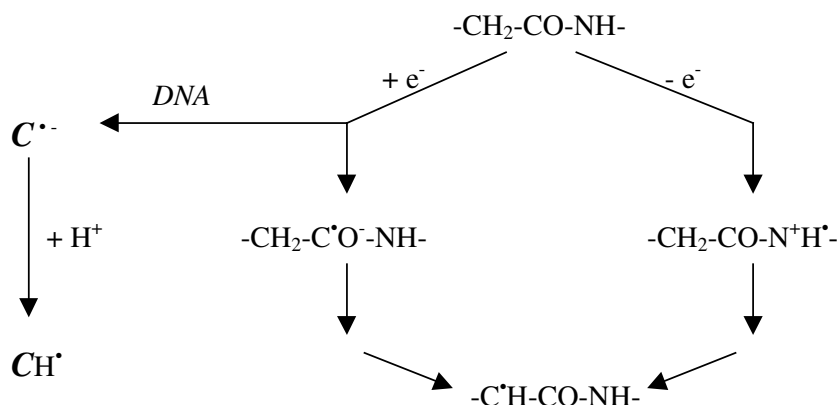
radikalene i komplekskrystallen kan det være mulig å få informasjon om en eventuell energioverføring mellom de to komponentene (i komplekset og ikke nødvendigvis i levende celler). Det er ekvimolare mengder av glysin og cytosin i komplekskrystallen og de to komponentene har omtrent like mange valenselektroner. I utgangspunktet skal det derfor oppstå like mange primærionisasjoner i glysin som i cytosin. I et ESR-absorpsjonsspekter er signalintensiteten proporsjonal med antall radikaler. Dersom cytosinradikalene bidrar med større intensitet enn glysinradikalene, kan det tenkes at skader som initielt oppstår i glysin delen overføres til cytosin delen. Det er kjent at i DNA migrerer elektroner til cytosin og hull til guanin (4). I komplekskrystallen kan det derfor være muligheter for elektrontransport til cytosin fra glysin.

Ved første forsøk viste simuleringer av ESR-spektre av C:NFG at glysinradikalet bidrar med omkring 70-80 % av intensiteten i spektrene, mens 5-yl og 6-yl bidrar med 5-15 % hver. Dette kunne indikere en overføring fra DNA til protein. Imidlertid ble det senere, for å få et bedre samsvar med eksperimentelle spektre, lagt til en bred singlett.

Regresjonsanalyse viste at denne singletten bidrar mer til det totale spekteret enn glysinradikalet for den akseorienteringen ($B \parallel \langle b \rangle$) det er størst grunn til å feste lit til. Andeler er vist i tabell 5.8. Ettersom et slikt fenomen, hvor en bred singlett må til for å gjenspeile ESR-spektrene, tidligere er observert i cytosin monohydrat (58), er det mest sannsynlig at singletten også her skyldes cytosinradikaler. Dermed er det ikke nødvendigvis mer aminosyreradikaler enn baseradikaler. Det er muligens heller mer cytosinradikaler, men ut fra simulerte aksespektre er det ikke grunnlag for å si noe detaljert om dette størrelsesforholdet. Én akseorientering viser størst andel glysinradikal, mens en annen viser omtrent like store mengder. Dermed er det heller ikke grunnlag for å si at det virkelig har foregått en energioverføring mellom de to komponentene, i retning fra aminosyren (protein) til basen (DNA), slik det er konkludert ut fra tidligere nevnte undersøkelser og observasjoner.

Avstanden fra C8 i NFG, hvor det er en netto hydrogenabstraksjon (K1), til C6 og C5 (H-addisjonssposisjoner) i cytosin i nabomolekylet er henholdsvis 3.7 og 4.4 Å. Avstanden fra C8 til C5 og C6 i den samme asymmetriske enhet er henholdsvis 6.9 og 7.6 Å. Det dannes betraktelig mer av glysinradikalet K1 enn av cytosinradikalene 5-yl og 6-yl til sammen. De korte avstandene gir en mulighet for at glysin kan opptre som donor.

I følge Faucitano *et al.* (68) opptrer DNA-baser som elektroninnfangere og hindrer det anioniske forløpet i radiolysen av proteinet i kromatin, som illustrert i figur 6.2. Symons (71) beskriver en økning i baseradikaler i kromatin og komplekser, som må bety at det er en signifikant overføring av elektroner, generert i histonene, til DNA. Det er i de samme observasjonene ingenting som tyder på hulltransport til DNA. Det kan tenkes at en tilsvarende elektronoverføring kan forekomme i cytosin:N-formylglysin, dersom 6-yl og 5-yl dannes som forløp **2** og **4** (via anionet).



Figur 6.2: Skjema for spinoverføringsmekanismen mellom proteiner og DNA, C er cytosin. Fritt etter beskrivelse gitt av Faucitano *et al.* (68)

Symons (71) oppsummerte i 1987 at histonene fungerer som strålingssensitiserende forbindelser, og at elektron-innfangere er viktigere enn hull-innfangere for å beskytte DNA i en slik sammenheng. Weiland og Hüttermann (9) observerte at størrelsesforholdet mellom oksidasjonsprodukter og reduksjonsprodukter i DNA i bestrålt kromatin er stabilisert ved 77 K, og at det er reduksjonsproduktene som dominerer. Oppvarmings-eksperimenter viste at de individuelle kromatinradikalene (histonradikaler og DNA-radikaler) har den samme utviklingen i kromatin som separat, slik at påfølgende reaksjoner (etter 77 K) skjer uavhengig innen de to delene, histoner og DNA. I motsetning til Faucitano *et al.* (68) hevder Weiland og Hüttermann (9) å ha funnet at α -karbonradikaler (histonradikaler analoge med K1 i NFG) i kromatin opptrer allerede ved 77 K.

Komplekskrystallen syntes å være mindre sensitiv for stråling enn NFG, siden den måtte ha større dose for å gi spektre med sammenlignbare signal/støy-forhold. Dette kan skyldes at det i komplekskrystallene er en høyere andel av primære rekombinasjoner (72,

73). Dersom et elektron blir slått løs etter bestråling (kationdannelse), kan elektronet unnsnippe sitt kation dersom det har tilstrekkelig kinetisk energi. Hvis energien er for lav, er det stor sannsynlighet for at kationet og elektronet vil rekombinere. I tillegg vil et hydrogenbindingsnettverk i krystaller gi mulighet for ladningsoverføringer ved flere etterfølgende protonforskyvninger. På denne måten vil spinn og ladning separeres før den positive ladningen eventuelt rekombinerer med et elektron. Overlapping av π -orbitaler er også viktig for transport av elektroner (og hull) og dermed også for muligheten for rekombinasjoner mellom elektroner og kationer slik at radikalutbyttet blir lavere (72). I komplekskrystallen holder to hydrogenbindinger ett cytosin og ett N-formylglysinmolekyl sammen. Dette kan muliggjøre forskyvning av positiv ladning (fra kationdannelse) mot den av de to komponentene hvor slik lokalisering er energetisk mest gunstig. Det er i tillegg tre andre typer hydrogenbindinger mellom de ulike asymmetriske enhetene, men det lave radikalutbyttet tyder på at disse ikke tillater mange etterfølgende ladningsforskyvninger. Hvis H-bindingsskjemaet er av en slik art at suksessive protonforskyvninger ikke er gunstig, vil protonet etter deprotonering av et primært kation befinne seg nær modermolekylet. Systemet vil da være utsatt for ladningsrekombinering med annihilasjon av spinn, enten ved direkte innfangning av et elektron, eller ved elektrontransport via overlappende π -orbitaler. Det er ikke gjort noe forsøk på nærmere analyse av slike fenomener i dette arbeidet.

Det er i det foreliggende arbeidet benyttet de fleste verktøy tilgjengelig for analyse av ESR- og ENDOR-data, uten at det har gitt klare svar på radikalstrukturer og eventuelle energioverføringer. De presenterte resultatene kan derfor ikke vise noe mer enn det som er gjort tidligere med hensyn på slike overføringer. Hvis det er tilfellet at det er en overføring fra glysin til cytosin, betyr det at histonene ikke gir noen signifikant beskyttelse av DNA-molekylet mot ioniserende stråling. Det ville ikke være uventet om histonene beskytter DNA-molekylet, for eksempel slik histonene beskytter mot nukleaser, og som beskyttelse mot OH-radikaler som antatt av Tomita *et al.* (74). Samtidig kan det være like viktig at proteinene rundt DNA fungerer som de skal (og "beskyttes" av DNA), blant annet for å holde heliksen oppkveilet. Det finnes heller ikke velutviklede reparasjonsmekanismer for proteinskader slik det gjør for DNA-skader (1). Her må også forslaget fra Wagenknecht *et al.* (69) nevnes, om at energioverføringsmekanismer kan inngå i prosesser i forbindelse med reparasjon av DNA.

6.4 Forslag til videre arbeid

Det eksisterer ikke noen andre kjente radikalundersøkelser av NFG. For NFG vil lavtemperaturreksperimenter kunne gi bedre oppløsning og mer informasjon om de radikaler som dannes. Større (renere) krystaller vil gi bedre signal/støy-forhold slik at det blir lettere å identifisere linjeposisjoner. Undersøkelser av deutrerete krystaller vil gi svar på om det er hydrogenatomet i formylgruppen eller det nitrogenbundne hydrogenatomet som gir opphav til tensor 2 i K1 i isolert NFG. Det vil trolig også redusere linjebredden og øke oppløsningen.

For cytosin:N-formylglysin vil lavtemperaturreksperimenter (og oppvarming) kunne gi et bedre svar på eventuelle overføringer mellom de to komponentene. Det ville også vært svært verdifullt å få ENDOR-signaler fra komplekskrystallen. Da ville det være mulig å skille radikalene og samtidig gi mye bedre estimater av koblingsstørrelsene. Deutrerete krystaller vil også kunne eliminere alternative radikalkandidater. Bedre eksperimentelle data vil i sin tur kunne gi et bedre svar på hvordan spektrene er satt sammen. På den annen side er pulverspektre bedre egnet for å gi informasjon i forhold til radikalandeler enn enkrystallstudier. Det er lavere utbytte av DNA-radikaler i en mekanisk blanding av DNA og histoner enn i kromatin (68). I komplekskrystallen er alle cytosinmolekyler i kontakt med glysinmolekyler, og omvendt. Dersom pulverforsøk viser en lavere andel cytosinradikaler enn i komplekskrystallen, kan det bety at det stabiliseres en høyere andel base(DNA)-radikaler i komplekskrystallen på grunn av molekylær kontakt som muliggjør energioverføring.

I forbindelse med undersøkelser av energioverføringsprosesser i komplekser av DNA og histoner vil det også være aktuelt å studere andre forbindelser, for eksempel komplekser av cytosin og hippursyre (N-benzoylglysin), som har kjent krystallstruktur (11), eller av CMP og arginin (75). Disse kompleksene er av de få aktuelle som er kjent.

Referanser

1. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publ. Inc., New York (1994)
2. E.J. Hall, *Radiobiology for the Radiologist*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1994)
3. F.H. Attix, *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. John Wiley & Sons Inc., New York (1986)
4. D. Becker and M.D. Sevilla, The chemical consequences of radiation damage to DNA. *Advances in Radiation Biology* **17**, 121-180 (1993)
5. J.D. Watson and F.H.C. Crick, Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature* **171**, 737-738 (1953)
6. K. Luger, A.W. Mäder, R.K. Richmond, D.F. Sargent and T.J. Richmond, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260 (1997)
7. G.V. Childs, A Microscopists' View of Chromosome Organization. (1996)
<http://cellbio.utmb.edu/cellbio/nucleus2.htm> [Hentet 1. februar 2002]
8. P. Alexander, J.T. Lett and M.G. Ormerod, Energy transfer in irradiated deoxyribonucleic acid and nucleoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 207-209 (1961)
9. B. Weiland and J. Hüttermann, Spin transfer from protein to DNA in x-irradiated 'dry' and hydrated chromatin: An electron spin resonance investigation of spectral components between 77 K and room temperature. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 1075-1084 (2000)
10. Y. Sasada and A. Takenaka, Studies of protein-nucleic acid interactions using model crystals. *Adv. Biophys.* **24**, 57-92 (1988)
11. C. Tamura, T. Hata, S. Sata and N. Sakurai, Studies on Intermolecular Complex Formation. II. Crystal Structure of Cytosine-N-Benzoylglycine Complex Monohydrate. *Bulletin of The Chemical Society of Japan* **45**, 3254-3261 (1972)
12. E. Westhof, Formation of H-adduct radicals in cytosine and its derivatives. *Int. J. Radiat. Biol.* **23**, 389-400 (1973)
13. E. Westhof, W. Flossmann and A. Müller, Radical formation in salts of pyrimidines. II. Cytosine.HCl crystals. *Int. J. Radiat. Biol.* **28**, 427-438 (1975)

14. E. Sagstuen, E.O. Hole, W.H. Nelson and D. Close, Protonation state of radiation-produced cytosine anions and cations in the solid state. EPR/ENDOR of cytosine monohydrate single crystals x-irradiated at 10 K. *J. Phys. Chem.* **96**, 8269-8276 (1992)
15. E.O. Hole, W.H. Nelson, E. Sagstuen and D.M. Close, Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance studies of x-irradiated crystals of cytosine hydrochloride. Part 1: Free radical formation at 10K after high radiation doses. *Radiat. Res.* **149**, 109-119 (1998)
16. N.M. Atherton, *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall, London (1993)
17. W. Gordy, *Theory and Application of Electron Spin Resonance*. John Wiley & Sons, New York (1980)
18. A. Carrington and A.D. McLachlan, *Introduction to magnetic resonance: with applications to chemistry and chemical physics*. Harper & Row, New York (1967)
19. H.M. McConnell and D.B. Chesnut, Theory of isotropic hyperfine interaction in π -electron radicals. *J. Chem. Phys.* **28**, 107-117 (1958)
20. W.A. Bernhard, Solid-State Radiation Chemistry of DNA: The Bases. *Advances in Radiation Biology* **9**, 199-280 (1981)
21. C. Heller and H.M. McConnell, Radiation damage in organic crystals. II. Electron spin resonance of $(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})$ in β -succinic acid. *J. Chem. Phys.* **32**, 1535-1539 (1960)
22. S.A. Nelson, Twinning, Polymorphism, Polytypism, Pseudomorphism. (2002) <http://www.tulane.edu/~sanelson/geol211/twinning.htm> [Hentet 17. september 2002]
23. M. Ohki, A. Takenaka, H. Shimanouchi and Y. Sasada, Complexes between Nucleotide Base and Amino Acid. I. Crystal Structure of Cytosine:N-Formylglycine. *Bulletin of The Chemical Society of Japan* **48**, 848-852 (1975)
24. P.M.W. Gill, Density Functional Theory (DFT), Hartree-Fock (HF), and the Self-consistent Field. In *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, Vol. 1 (P. R. Schreiner, Eds.), 678-689. John Wiley & Sons Inc., Chichester (1998)
25. J.B. Foresman and Æ. Frisch, *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA (1996)
26. A.D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A* **38**, 3098-3100 (1988)
27. C. Lee, W. Yang and R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* **37**, 785-789 (1988)

28. A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648-5652 (1993)
29. Background Reading for Basis Sets. The Shodor Education Foundation, Inc. (2000) <http://www.shodor.org/chemviz/basis/students/background.html> [Hentet 16. september 2002]
30. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle and J.A. Pople, *Gaussian 98. Revision A.9*. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA. 1998
31. J.W. Gault, L.A. Eriksson and L. Radom, Assessment of Procedures for Calculating Radical Hyperfine Structures. *J. Phys. Chem. A* **101**, 1352-1359 (1997)
32. *Bruker WINEPR System. Version 2.11*. Bruker-Franzen Analytik GmbH, 1996
33. E. Sagstuen, Personlig kommunikasjon.
34. W.H. Nelson and C. Gill, ESR and ENDOR studies of x-irradiated 4-phenyl-3-thiosemicarbazide single crystals. *Mol. Phys.* **36**, 1779-1788 (1978)
35. W.H. Nelson, Estimation of errors in eigenvectors and eigenvalues from magnetic resonance results using linear data-fitting techniques. *J. Magn. Reson.* **38**, 71-78 (1980)
36. E. Sagstuen, O. Awadelkarim, A. Lund and J. Masiakowski, Trapping site geometry of $N_2H_4^+$ radical ion in x-irradiated single crystals of $N_2H_5HC_2O_4$: An ENDOR study. *J. Chem. Phys.* **85**, 3223 - 3228 (1986)
37. E. Sagstuen, E.O. Hole, S.R. Haugedal, A. Lund, O.I. Eid and R. Erickson, EPR and ENDOR analysis of x-irradiated l-alanine and $NaHC_2O_4 \cdot H_2O$. Simulation of microwave power dependence of satellite lines. *Nukleonika* **42**, 353-372 (1997)
38. E. Sagstuen, A. Lund, Y. Itagaki and J. Maruani, Weakly Coupled Proton Interaction in the Malonic Acid Radical: Single Crystal ENDOR Analysis and EPR Simulation at Microwave Saturation. *J. Phys. Chem. A* **104**, 6362-6371 (2000)
39. J.A. Pople and D.L. Beveridge, *Approximate Molecular Orbital Theory*. McGraw Hill, New York (1970)

40. H. Oloff and J. Hüttermann, INDO characterization of α -halogen interaction in planar radicals from irradiated 5-halouracils. *J. Magn. Reson.* **40**, 415-437 (1980)
41. P. Ugliengo, D. Viterbo and G. Chiari, *Moldraw. Release 1.0, Version G.*
42. W.A. Bernhard, The use of α - hyperfine coupling tensors as a measure of unpaired spin density and free radical geometry. *J. Chem. Phys.* **81**, 5928-5936 (1984)
43. J.R. Morton, Electron Spin Resonance in Irradiated Glycine Crystals. *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 2325-2329 (1964)
44. M. Brustolon, V. Chis, A.L. Maniero and L.-C. Brunel, New radical detected by HF-EPR, ENDOR and Pulsed EPR in a room temperature irradiated single crystal of glycine. *J. Phys. Chem. A* **101**, 4887-4892 (1997)
45. A. Sanderud and E. Sagstuen, EPR and ENDOR studies of single crystals of α -glycine X-ray irradiated at 295 K. *J. Phys. Chem. B* **102**, 9353 - 9361 (1998)
46. I. Miyagawa, Y. Kurita and W. Gordy, Electron Spin Resonance of an Irradiated Single Crystal of N-Acetylglycine. *J. Chem. Phys.* **33**, 1599-1603 (1960)
47. M. Katayama and W. Gordy, Electron Spin Resonance of γ -Irradiated Glycylglycine. *J. Chem. Phys.* **35**, 117-122 (1960)
48. N.A. Salih, A. Sanderud, E. Sagstuen, O.I. Eid and A. Lund, ESR and ENDOR Studies of Hippuric Acid Single Crystals X-Irradiated at 295 K: A Reinvestigation. *J. Phys. Chem. A* **101**, 8214-8220 (1997)
49. G. Saxebøl, T.B. Melø and T. Henriksen, Electron Spin Resonance Studies of Electron Irradiated Peptides. A Single Crystal of N-Acetylglycine at 77 K. *Radiat. Res.* **55**, 356-368 (1973)
50. D.M. Close, E.O. Hole, E. Sagstuen and W.H. Nelson, EPR and ENDOR studies of x-irradiated single crystals of deoxycytidine 5'-phosphate monohydrate at 10 K. *J. Phys. Chem. A* **102**, 6737-6744 (1998)
51. H.C. Box, W.R. Potter and E.E. Budzinski, The reduction of nucleotides by ionizing radiation: uridine 5' phosphate and cytidine 3' phosphate. *J. Chem. Phys.* **62**, 476-478 (1975)
52. E. Sagstuen, E.O. Hole, S.R. Haugedal and W.H. Nelson, Alanine radicals: Structure determination by EPR and ENDOR of single crystals x-irradiated at 295 K. *J. Phys. Chem. A* **101**, 9763-9772 (1997)
53. N.I. Huuse, Et ESR og ENDOR studium av røntgenbestrålte enkrystaller av cytosin-HCl og 5'dCMP. Hovedoppgave i fysikk, Universitetet i Oslo (1998)
54. D.M. Close and W.A. Bernhard, ESR and ENDOR study of 5'dCMP at 6K. *J. Chem. Phys.* **70**, 210-215 (1979)

55. E.O. Hole, E. Sagstuen, W.H. Nelson and D.M. Close, Free Radical Formation in X-Irradiated Crystals of 2'-Deoxycytidine Hydrochloride. Electron Magnetic Resonance Studies at 10 K. *Radiat. Res.* **153**, 823-834 (2000)
56. W. Flossmann, E. Westhof and A. Müller, Radical formation in salts of pyrimidines III. Cytosine: H₂O crystals. *Int. J. Radiat. Biol.* **30**, 305-315 (1976)
57. A. Krivokapić, Strålingsindusert hulltransport i krystaller av cytosin·HCl dopet med 5-metylcytosin·HCl. Hovedoppgave i fysikk, Universitetet i Oslo (2002)
58. E. Malinen, Stråleskader i tymin og cytosin ved røntgen-, proton- og α-bestråling: Et ESR-studium av LET-effekter. Hovedoppgave i fysikk, Universitetet i Oslo (1995)
59. G. Saxebøl, T.B. Melø and T. Henriksen, Electron Spin Resonance Studies and INDO MO-Calculations of Electron Irradiated Peptides. A single Crystal of N-Acetylglycine. *Radiat. Res.* **51**, 31-44 (1972)
60. V.P. Chacko, C.A. McDowell and B.C. Singh, ENDOR-study of x-irradiated single crystals of N-Acetylglycine - A reinvestigation. *J. Chem. Phys.* **72**, 5228-5233 (1980)
61. A. Minegishi, R. Bergene and P. Riesz, ESR of spin-trapped radicals in gamma-irradiated polycrystalline amino acids, N-acetyl amino acids and dipeptides. *Int. J. Radiat. Biol.* **38**, 627-650 (1980)
62. T. Henriksen, T.B. Melø and G. Saxebøl, Free Radical Formed in Proteins and Protection from Radiation Damage. In *Free Radicals in Biology*, Vol. II (W. A. Pryor, Eds.), 213-256. Academic Press, Inc., New York (1976)
63. E. Westhof, W. Flossmann and A. Müller, Detection of an OH-addition radical and its possible decay product in single crystals of cytosine monohydrate. *Radiat. Res.* 304-311 (1977)
64. C. Lücke-Huhle, A. Braun and U. Hagen, Oxygen Effect in gamma-irradiated DNA. *Zeitschrift für Naturforschung* **25 b**, 1264-1268 (1970)
65. S.C. Lillicrap and E.M. Fielden, Energy Transfer Between Protein and DNA in Nucleoprotein. *Int. J. Radiat. Biol.* **21**, 137-144 (1972)
66. M. Olast and A.J. Bertinchamps, Electron transfer in gamma-irradiated complexes between aromatic amino acids and DNA derivatives. *Int. J. Radiat. Biol.* **24**, 589-594 (1973)
67. P.M. Cullis, G.D.D. Jones, M.C.R. Symons and J.S. Lea, Electron transfer from protein to DNA in irradiated chromatin. *Nature* **330**, 773-774 (1987)
68. A. Faucitano, A. Buttafava, F. Martinotti and G. Pedraly-Noy, ESR Study of the Direct Radiolysis of DNA, DNA-Histones and DNA-Intercalators Complexes. *Radiat. Phys. Chem.* **40**, 357-364 (1992)

69. H.-A. Wagenknecht, E.D.A. Stemp and J.K. Barton, Evidence of Electron Transfer from Peptides to DNA: Oxidation of DNA-bound Tryptophan Using the Flash-Quench Technique. *Int. J. Radiat. Biol.* **122**, 1-7 (2000)
70. M.D. Sevilla, D. Becker, M. Yan and S.R. Summerfield, Relative Abundance of Primary Ion Radicals in γ -Irradiated DNA: Cytosine vs. Thymine Anion and Guanine vs. Adenine Cation. *J. Phys. Chem.* **95**, 3409-3415 (1991)
71. M.C.R. Symons, Application of Electron Spin Resonance Spectroscopy to the Study of the Effects of Ionizing Radiation on DNA and DNA Complexes. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **83**, 1-11 (1987)
72. W.A. Bernhard, J. Barnes, K.R. Mercer and N. Mroczka, The influence of packing on free radical yields in crystalline nucleic acids: the pyrimidine bases. *Radiat. Res.* **140**, 199-214 (1994)
73. W.A. Bernhard, N. Mroczka and J. Barnes, Combination is the dominant free radical process initiated in DNA by ionizing radiation: An overview based on solid-state EPR studies. *Int. J. Radiat. Biol.* **66**, 491-497 (1994)
74. H. Tomita, M. Kai, T. Kusama, Y. Aoki and A. Ito, Monte-Carlo simulation of DNA strand breaks induced by monoenergetic electrons using higher-order structure models of DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **66**, 669-682 (1994)
75. T.N. Bhat and M. Vijayan, An x-ray examination of a crystalline complex between cytidine monophosphoric acid and arginine. *Curr. Sci.* **42**, 123-124 (1973)

Appendiks

A DFT - inputfil

Her følger et eksempel på en fil med inndata brukt i forbindelse med DFT-beregninger:

```
%mem=60mb
%chk=nfg
#ub3lyp/6-31+G(D) NoSymm opt
NFG radical 1

0,2
O
C,1,B1
C,2,B2,1,A1
H,3,B3,2,A2,1,D1
O,2,B4,3,A3,4,D2
H,5,B5,2,A4,1,D3
N,3,B6,2,A5,1,D4
H,7,B7,3,A6,2,D5
C,7,B8,3,A7,4,D6
O,9,B9,7,A8,3,D7
H,9,B10,7,A9,3,D8
  Variables:
B1=1.2112
B2=1.5087
B3=1.09
B4=1.3229
...
B10=1.0
A1=120.0
...
A9=120.0
D1=180.0
D2=0.0
...
D8=180.0

--Link1--
%mem=60mb
%chk=nfg
#ub3lyp/6-311+G(2DF,P)NoSymm Prop=EPR scf=tight geom=checkpoint guess=read
NFG radical 1

0,2
```

Sørger for lagring av checkpointfilen for senere bruk.
Her oppgis funksjonal/basis-sett. opt for geometri-optimalisering ved bruk av gitt basissett
tittel for beregning

netto elektrisk ladning, spinnmultiplisitet (2S+1)
atom nr 1=oksygen
nr 2=karbon, bundet til nr 1, bindingsavstand C-O=B1
nr 3=karbon, C-C=B2, \angle C-C-O =A1
nr 4=hydrogen, , \angle H-C-C=A2, torsjons \angle H-C-C-O=D1

Her er geometrien lagt inn som en "Z-matrix". Det er også mulig å legge inn kartesiske koordinater.

Her angis størrelsen til variablene som skal optimaliseres. Dersom noen avstander/vinkler ønskes holdt konstant, kan de plasseres nedenfor variablene med overskriften Constants:. Da må NoSymm opt erstattes med Popt=Z-matrix

Torsjonsvinkler: cis ~ 0, trans ~180 (kan enkelt sjekkes ved bruk av *moldraw*)

Blank linje avslutter molekylspesifikasjonen
Starter ny jobb

Henter molekylær struktur mm fra beregningen over
Ny basis for nye beregninger. *
Tittel

Ladning, multiplisitet

* beregning av Prop=EPR hyperfinkoblingskonstanter og scf=tight single point energi med full konvergens ut fra molekylspesifikasjon i checkpointfilen fra beregningen over ved geom=checkpoint og guess=read.

B Simuleringsfil for komplekskrystallen

Cytosin:N-formylglysin, glysinradikal

```

3 1
2 -4 0 1
1
  1.00
 90.00
  0.00
9766.000000
 2.003900      0.00232      0.89487      -0.44633
 2.003500      0.02893      0.44600      0.89456
 2.002500      0.99979      -0.01198     0.01662
   0.5         1         5.58500
30.200000      0.07057      -0.99644     -0.04605
19.200000      0.99493      0.07363     -0.06844
10.400000      0.07159      -0.04099     0.99659
   0.5         1         5.58500
13.400000      0.00176      -0.98251     -0.18620
 8.700000      0.99997      0.00315     -0.00716
 8.500000      0.00762      -0.18618     0.98249
   1.0         1         0.40400
 2.000000      1.00000      0.00000      0.00000
 2.800000      0.00000      1.00000      0.00000
 3.000000      0.00000      0.00000      1.00000
 0.001000      1.00000      0.00000      0.00000
 0.001000      0.00000      1.00000      0.00000
 0.001000      0.00000      0.00000      1.00000
 4.600000      1.00000      0.00000      0.00000
 3.000000      0.00000      1.00000      0.00000
 5.000000      0.00000      0.00000      1.00000
 1 0.500000      0.10000      0.10000      0.50000  F 1
3405.700000    0.146432    3555.50000    0.05
 0 1.0000      F F F

```

END

C:NFG, cytosinradikal 5-yl

```

6 1
2 -4 0 1
1
  1.00
 90.00
  0.00
9766.000000
 2.003500      1.000000      0.000000      0.000000
 2.003200      0.000000      1.000000      0.000000
 2.005000      0.000000      0.000000      1.000000
   0.5         1         5.585000
28.000000      -0.0379      -0.9992      -0.0006
18.600000      -0.7749      0.0333      0.6312
 9.000000      -0.6686      0.0207      -0.7433
   0.5         1         5.585000
45.000000      1.000000      0.000000      0.000000
46.000000      0.000000      1.000000      0.000000
45.000000      0.000000      0.000000      1.000000
   0.5         1         5.585000
45.000000      1.000000      0.000000      0.000000
46.000000      0.000000      1.000000      0.000000
45.000000      0.000000      0.000000      1.000000
   0.5         1         5.585000
 4.000000      -0.5545      0.5012      -0.6642
 0.000000      -0.7749      0.0333      0.6312
 0.000000      -0.3437      -0.8649      -0.3657
   1.0         1         0.4040
1.500000      -0.7588      0.0230      0.6509
 0.000000      -0.0306      -0.9992      -0.0003
 0.000000      -0.6686      0.0207      -0.7433
 0.001000      -0.7588      0.0230      0.6509
 0.001000      -0.0306      -0.9992      -0.0003
 0.001000      -0.6686      0.0207      -0.7433
   0.5         1         5.585000
 0.000000      1.000000      0.000000      0.000000
 5.300000      0.000000      1.000000      0.000000
 0.000000      0.000000      0.000000      1.000000

```


Appendiks

```

      2.00000      1.000000      0.000000      0.000000
      2.800000      0.000000      1.000000      0.000000
      1.800000      0.000000      0.000000      1.000000
1     0.50000      0.100000      0.100000      0.500000 F 1
      3405.700000      0.146432      3555.5000      0.05
0     1.0000      F F F
*END*
C:NFG cytosinradikal 6-yl
4     1
2     -4      0      1
1
      1.000
      90.00
      0.00
      9766.0000
      2.004800      1.000000      0.000000      0.000000
      2.003500      0.000000      1.000000      0.000000
      2.004500      0.000000      0.000000      1.000000
      0.5          1          5.585000
      29.000000      -0.5985      0.3517      -0.7272
      16.900000      0.7660      -0.0423      -0.6414
      9.200000      -0.2583      -0.9280      -0.2395
      0.5          1          5.585000
      23.000000      1.000000      0.000000      0.000000
      23.000000      0.000000      1.000000      0.000000
      23.000000      0.000000      0.000000      1.000000
      0.5          1          5.585000
      45.000000      1.000000      0.000000      0.000000
      45.000000      0.000000      1.000000      0.000000
      45.000000      0.000000      0.000000      1.000000
      1.0          1          0.404000
      0.000000      -0.7588      0.0230      0.6509
      -2.500000      -0.0306      -0.9992      -0.0003
      -2.500000      -0.6686      0.0207      -0.7433
      0.001000      -0.7588      0.0230      0.6509
      0.001000      -0.0306      -0.9992      -0.0003
      0.001000      -0.6686      0.0207      -0.7433
      3.500000      1.000000      0.000000      0.000000
      3.000000      0.000000      1.000000      0.000000
      3.000000      0.000000      0.000000      1.000000
1     0.50000      0.100000      0.100000      0.500000 F 1
      3405.700000      0.146432      3555.5000      0.05
0     1.0000      F F F
*END*
C:NFG radikal x singlett
0     1
2     -4      0      1
1
      1.000
      90.00
      0.00
      9766.000000
      2.005000      1.000000      0.000000      0.000000
      2.003800      0.000000      1.000000      0.000000
      2.004800      0.000000      0.000000      1.000000
      13.000000      1.000000      0.000000      0.000000
      14.000000      0.000000      1.000000      0.000000
      18.000000      0.000000      0.000000      1.000000
1     0.50000      0.100000      0.100000      0.500000 F 1
      3405.700000      0.146432      3555.0000      0.05
0     1.0000      F F F
*END*
*****

```

C Krystallografiske data

Data fra *esrlib* er her gitt for N-formylglysin (inputdata fra Carl Henrik Gørbitz, Kjemisk institutt, UiO) og cytosin:N-formylglysin (inputdata fra Ohki *et al.* (23)).

C1 Krystallografiske data for N-formylglysin

ANTALL ATOMER ER 12

KRYSTALLAKSER

A0= 7.438

B0= 9.165

C0= 7.100

DEN MONOKLINE VINKEL BETA ER 116.348 GRADER

INPUTDATA FOR N-FORMYLGLYSIN

Atomnummer	x	y	z	Atomsymbol
1	0.3535	0.5199	0.7255	O1
2	0.3605	0.7359	0.8777	O2
3	0.2160	0.7010	0.8530	H2
4	1.0121	0.6894	0.8411	O3
5	0.7322	0.5586	0.7632	N1
6	0.6680	0.4790	0.7180	H1
7	0.4401	0.6305	0.8118	C1
8	0.6558	0.6629	0.8631	C2
9	0.6720	0.7570	0.8210	H21
10	0.7320	0.6560	1.0120	H22
11	0.9076	0.5795	0.7612	C3
12	0.9470	0.5040	0.6960	H31

KOORDINATER I REFERANSESYSTEMET $\langle a \rangle$ $\langle b \rangle$ $\langle c^* \rangle$

Atomnummer	$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c^* \rangle$	Atomsymbol
1	0.3434	4.7650	4.6161	O1
2	-0.0848	6.7450	5.5845	O2
3	-1.0814	6.4247	5.4273	H2
4	4.8774	6.3182	5.3515	O3
5	3.0409	5.1195	4.8559	N1
6	2.7059	4.3900	4.5683	H1
7	0.7152	5.7785	5.1652	C1
8	2.1579	6.0756	5.4916	C2
9	2.4110	6.9379	5.2237	H21
10	2.2554	6.0122	6.4389	H22
11	4.3518	5.3107	4.8432	C3
12	4.8503	4.6192	4.4284	H31

BINDINGSAVSTANDER OG RETNINGSCOSINUSER

BINDING	AVSTAND	$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c^* \rangle$	NORM
O2 - O1 (2 - 1)	2.2454	0.1907	-0.8818	-0.4313	1.0000
H2 - O1 (3 - 1)	2.3330	0.6107	-0.7114	-0.3477	1.0000
N1 - O1 (5 - 1)	2.7313	-0.9876	-0.1298	-0.0878	1.0000
H1 - O1 (6 - 1)	2.3925	-0.9874	0.1567	0.0199	1.0000
C1 - O1 (7 - 1)	1.2112	-0.3070	-0.8368	-0.4533	1.0000
C2 - O1 (8 - 1)	2.4034	-0.7550	-0.5453	-0.3643	1.0000
H21- O1 (9 - 1)	3.0604	-0.6756	-0.7100	-0.1985	1.0000
H22- O1 (10- 1)	2.9214	-0.6545	-0.4269	-0.6240	1.0000
H2 - O2 (3 - 2)	1.0586	0.9415	0.3026	0.1485	1.0000
N1 - O2 (5 - 2)	3.5977	-0.8688	0.4518	0.2025	1.0000
H1 - O2 (6 - 2)	3.7903	-0.7363	0.6213	0.2681	1.0000
C1 - O2 (7 - 2)	1.3229	-0.6048	0.7306	0.3170	1.0000
C2 - O2 (8 - 2)	2.3423	-0.9575	0.2858	0.0397	1.0000
H21- O2 (9 - 2)	2.5292	-0.9868	-0.0763	0.1427	1.0000
H22- O2 (10- 2)	2.5969	-0.9012	0.2822	-0.3290	1.0000
C1 - H2 (7 - 3)	1.9272	-0.9323	0.3353	0.1360	1.0000
C2 - H2 (8 - 3)	3.2587	-0.9940	0.1071	-0.0197	1.0000
H21- H2 (9 - 3)	3.5359	-0.9877	-0.1452	0.0576	1.0000
H22- H2 (10- 3)	3.5111	-0.9504	0.1175	-0.2881	1.0000
N1 - O3 (5 - 4)	2.2484	0.8168	0.5331	0.2204	1.0000
H1 - O3 (6 - 4)	3.0078	0.7220	0.6411	0.2604	1.0000
C2 - O3 (8 - 4)	2.7339	0.9947	0.0887	-0.0512	1.0000
H21- O3 (9 - 4)	2.5463	0.9686	-0.2434	0.0502	1.0000
H22- O3 (10- 4)	2.8550	0.9184	0.1072	-0.3809	1.0000
C3 - O3 (11- 4)	1.2448	0.4222	0.8093	0.4083	1.0000
H31- O3 (12- 4)	1.9338	0.0140	0.8786	0.4774	1.0000
H1 - N1 (6 - 5)	0.8527	0.3930	0.8555	0.3373	1.0000
C1 - N1 (7 - 5)	2.4370	0.9543	-0.2704	-0.1269	1.0000
C2 - N1 (8 - 5)	1.4484	0.6097	-0.6601	-0.4388	1.0000
H21 - N1 (9 - 5)	1.9593	0.3215	-0.9281	-0.1877	1.0000
H22 - N1 (10- 5)	1.9799	0.3967	-0.4509	-0.7995	1.0000
C3 - N1 (11- 5)	1.3248	-0.9895	-0.1443	0.0096	1.0000
H31- N1 (12- 5)	1.9254	-0.9398	0.2599	0.2221	1.0000
C1 - H1 (7 - 6)	2.4994	0.7965	-0.5555	-0.2388	1.0000
C2 - H1 (8 - 6)	1.9984	0.2742	-0.8434	-0.4620	1.0000
H21- H1 (9 - 6)	2.6473	0.1114	-0.9625	-0.2476	1.0000
H22- H1 (10- 6)	2.5167	0.1790	-0.6446	-0.7433	1.0000
C3 - H1 (11- 6)	1.9059	-0.8636	-0.4830	-0.1442	1.0000
H31- H1 (12- 6)	2.1612	-0.9923	-0.1060	0.0648	1.0000
C2 - C1 (8 - 7)	1.5087	-0.9563	-0.1969	-0.2164	1.0000
H21- C1 (9 - 7)	2.0551	-0.8252	-0.5641	-0.0285	1.0000
H22- C1 (10- 7)	2.0123	-0.7654	-0.1161	-0.6330	1.0000
C3 - C1 (11- 7)	3.6807	-0.9880	0.1271	0.0875	1.0000
H21- C2 (9 - 8)	0.9378	-0.2700	-0.9195	0.2856	1.0000
H22- C2 (10- 8)	0.9545	-0.1022	0.0663	-0.9925	1.0000
C3 - C2 (11- 8)	2.4122	-0.9095	0.3171	0.2688	1.0000
H31- C2 (12- 8)	3.2405	-0.8309	0.4494	0.3281	1.0000
H22- H21 (10- 9)	1.5356	0.1013	0.6028	-0.7914	1.0000
C3 - H21 (11- 9)	2.5611	-0.7578	0.6354	0.1486	1.0000
H31- H21 (12- 9)	3.4582	-0.7054	0.6705	0.2300	1.0000
C3 - H22 (11-10)	2.7264	-0.7689	0.2573	0.5853	1.0000
H31- H22 (12-10)	3.5660	-0.7277	0.3907	0.5638	1.0000
H31- C3 (12-11)	0.9480	-0.5258	0.7294	0.4376	1.0000

C2 Krystallografiske data for cytosin:N-formylglysin

ANTALL ATOMER ER 25

KRYSTALLAKSER

A0= 8.444

B0=21.169

C0= 5.120

DEN MONOKLINE VINKEL BETA ER 90.0 GRADER

INPUTDATA FOR CYTOSIN:N-FORMYLGLYSIN

Atomnummer	x	y	z	Atomsymbol
1	0.0958	0.1242	0.2119	N1
2	0.1515	0.1803	0.3108	C2
3	0.0951	0.2340	0.1945	N3
4	-0.0052	0.2340	-0.0107	C4
5	-0.0601	0.1751	-0.1090	C5
6	-0.0079	0.1222	0.0082	C6
7	0.2465	0.1819	0.4900	O2
8	-0.0475	0.2887	-0.1078	N4
9	0.0561	0.4017	0.1284	O3
10	0.1924	0.3408	0.4033	O4
11	0.3165	0.5219	0.0347	O5
12	0.1519	0.5107	0.3845	N5
13	0.1462	0.3934	0.3181	C7
14	0.2114	0.4498	0.4680	C8
15	0.2089	0.5408	0.1798	C9
16	0.1330	0.0880	0.2970	H1
17	0.1330	0.2720	0.2610	H3
18	-0.0100	0.3260	-0.0360	H41
19	-0.1140	0.2880	-0.2430	H42
20	-0.1370	0.1760	-0.2500	H5
21	-0.0420	0.0780	-0.0390	H6
22	0.3260	0.4500	0.4430	H81
23	0.1800	0.4450	0.6490	H82
24	0.1630	0.5800	0.1330	H9
25	0.0760	0.5280	0.4740	H10

KOORDINATER I REFERANSESYSTEMET <a> <c>

Atomnummer	<a>		<c>	Atomsymbol
1	0.8089	2.6290	1.0849	N1
2	1.2793	3.8157	1.5913	C2
3	0.8030	4.9527	0.9958	N3
4	-0.0439	4.9542	-0.0548	C4
5	-0.5075	3.7056	-0.5581	C5
6	-0.0667	2.5877	0.0420	C6
7	2.0814	3.8511	2.5088	O2
8	-0.4011	6.1113	-0.5519	N4
9	0.4737	8.5040	0.6574	O3
10	1.6246	7.2152	2.0649	O4
11	2.6725	11.0473	0.1777	O5
12	1.2826	10.8119	1.9686	N5
13	1.2345	8.3283	1.6287	C7
14	1.7851	9.5222	2.3962	C8
15	1.7640	11.4488	0.9206	C9
16	1.1231	1.8629	1.5206	H1

Appendiks

Atomnummer	<a>		<c>	Atomsymbol
17	1.1231	5.7580	1.3363	H3
18	-0.0844	6.9011	-0.1843	H41
19	-0.9626	6.0967	-1.2442	H42
20	-1.1568	3.7257	-1.2800	H5
21	-0.3546	1.6512	-0.1997	H6
22	2.7527	9.5260	2.2682	H81
23	1.5199	9.4202	3.3229	H82
24	1.3764	12.2780	0.6810	H9
25	0.6417	11.1772	2.4269	H10

BINDINGSAVSTANDER OG RETNINGSCOSINUSER

BINDING	AVSTAND	<a>		<c>	NORM
C2 - N1 (2 - 1)	1.3733	-0.3425	-0.8641	-0.3687	1.0000
N3 - N1 (3 - 1)	2.3254	0.0025	-0.9993	0.0383	1.0000
C4 - N1 (4 - 1)	2.7263	0.3128	-0.8529	0.4180	1.0000
C5 - N1 (5 - 1)	2.3647	0.5567	-0.4553	0.6948	1.0000
C6 - N1 (6 - 1)	1.3624	0.6427	0.0303	0.7655	1.0000
O2 - N1 (7 - 1)	2.2672	-0.5613	-0.5390	-0.6280	1.0000
H1 - N1 (16- 1)	0.9356	-0.3357	0.8188	-0.4657	1.0000
H3 - N1 (17- 1)	3.1547	-0.0996	-0.9918	-0.0797	1.0000
H5 - N1 (20- 1)	3.2650	0.6021	-0.3359	0.7243	1.0000
H6 - N1 (21- 1)	1.9900	0.5847	0.4913	0.6455	1.0000
N3 - C2 (3 - 2)	1.3690	0.3479	-0.8305	0.4350	1.0000
C4 - C2 (4 - 2)	2.3993	0.5515	-0.4745	0.6861	1.0000
C5 - C2 (5 - 2)	2.7972	0.6388	0.0394	0.7684	1.0000
C6 - C2 (6 - 2)	2.3917	0.5628	0.5135	0.6478	1.0000
O2 - C2 (7 - 2)	1.2192	-0.6579	-0.0290	-0.7525	1.0000
N4 - C2 (8 - 2)	3.5618	0.4718	-0.6445	0.6017	1.0000
H1 - C2 (16- 2)	1.9604	0.0797	0.9962	0.0360	1.0000
H3 - C2 (17- 2)	1.9651	0.0795	-0.9884	0.1297	1.0000
H41- C2 (18- 2)	3.8121	0.3577	-0.8094	0.4658	1.0000
H5 - C2 (20- 2)	3.7666	0.6468	0.0239	0.7623	1.0000
H6 - C2 (21- 2)	3.2500	0.5027	0.6660	0.5511	1.0000
C4 - N3 (4 - 3)	1.3495	0.6276	-0.0011	0.7785	1.0000
C5 - N3 (5 - 3)	2.3848	0.5495	0.5229	0.6516	1.0000
C6 - N3 (6 - 3)	2.6943	0.3228	0.8778	0.3540	1.0000
O2 - N3 (7 - 3)	2.2665	-0.5641	0.4861	-0.6675	1.0000
N4 - N3 (8 - 3)	2.2777	0.5287	-0.5087	0.6795	1.0000
O3 - N3 (9 - 3)	3.5826	0.0919	-0.9913	0.0945	1.0000
O4 - N3 (10- 3)	2.6338	-0.3119	-0.8590	-0.4059	1.0000
C7 - N3 (13- 3)	3.4614	-0.1247	-0.9752	-0.1828	1.0000
H1 - N3 (16- 3)	3.1504	-0.1016	0.9808	-0.1666	1.0000
H3 - N3 (17- 3)	0.9310	-0.3437	-0.8649	-0.3657	1.0000
H41- N3 (18- 3)	2.4447	0.3630	-0.7970	0.4827	1.0000
H42- N3 (19- 3)	3.0731	0.5746	-0.3723	0.7289	1.0000
H5 - N3 (20- 3)	3.2444	0.6041	0.3782	0.7015	1.0000
H6 - N3 (21- 3)	3.6972	0.3131	0.8930	0.3234	1.0000
C5 - C4 (5 - 4)	1.4238	0.3256	0.8769	0.3535	1.0000
C6 - C4 (6 - 4)	2.3686	0.0096	0.9991	-0.0409	1.0000
O2 - C4 (7 - 4)	3.5080	-0.6059	0.3145	-0.7308	1.0000
N4 - C4 (8 - 4)	1.3091	0.2729	-0.8839	0.3798	1.0000
O3 - C4 (9 - 4)	3.6574	-0.1415	-0.9706	-0.1947	1.0000
O4 - C4 (10- 4)	3.5199	-0.4740	-0.6424	-0.6022	1.0000
C7 - C4 (13- 4)	3.9816	-0.3211	-0.8474	-0.4228	1.0000
H1 - C4 (16- 4)	3.6606	-0.3188	0.8445	-0.4304	1.0000
H3 - C4 (17- 4)	1.9857	-0.5877	-0.4048	-0.7006	1.0000

Appendiks

BINDING	AVSTAND	<a>		<c>	NORM
H41- C4 (18- 4)	1.9516	0.0208	-0.9976	0.0664	1.0000
H42- C4 (19- 4)	1.8878	0.4866	-0.6052	0.6300	1.0000
H5 - C4 (20- 4)	2.0613	0.5399	0.5960	0.5944	1.0000
H6 - C4 (21- 4)	3.3207	0.0936	0.9947	0.0436	1.0000
C6 - C5 (6- 5)	1.3432	-0.3282	0.8323	-0.4467	1.0000
N4 - C5 (8- 5)	2.4080	-0.0442	-0.9990	-0.0026	1.0000
H1 - C5 (16- 5)	3.2211	-0.5062	0.5721	-0.6453	1.0000
H3 - C5 (17- 5)	3.2341	-0.5042	-0.6346	-0.5858	1.0000
H41- C5 (18- 5)	3.2449	-0.1304	-0.9848	-0.1152	1.0000
H42- C5 (19- 5)	2.5288	0.1800	-0.9455	0.2713	1.0000
H5 - C5 (20- 5)	0.9712	0.6686	-0.0207	0.7433	1.0000
H6 - C5 (21- 5)	2.0911	-0.0731	0.9825	-0.1714	1.0000
O2 - C6 (7- 6)	3.5065	-0.6126	-0.3603	-0.7035	1.0000
N4 - C6 (8- 6)	3.5889	0.0932	-0.9818	0.1655	1.0000
H1 - C6 (16- 6)	2.0316	-0.5856	0.3568	-0.7278	1.0000
H3 - C6 (17- 6)	3.6251	-0.3282	-0.8745	-0.3570	1.0000
H42- C6 (19- 6)	3.8431	0.2331	-0.9130	0.3347	1.0000
H5 - C6 (20- 6)	2.0570	0.5300	-0.5533	0.6427	1.0000
H6 - C6 (21- 6)	1.0091	0.2853	0.9280	0.2395	1.0000
O4 - O2 (10- 7)	3.4239	0.1334	-0.9825	0.1296	1.0000
H1 - O2 (16- 7)	2.4182	0.3963	0.8222	0.4086	1.0000
H1 - O2 (16- 7)	2.4182	0.3963	0.8222	0.4086	1.0000
H3 - O2 (17- 7)	2.4351	0.3936	-0.7831	0.4815	1.0000
O3 - N4 (9- 8)	2.8201	-0.3102	-0.8485	-0.4288	1.0000
O4 - N4 (10- 8)	3.4886	-0.5807	-0.3165	-0.7501	1.0000
C7 - N4 (13- 8)	3.5136	-0.4655	-0.6310	-0.6206	1.0000
H3 - N4 (17- 8)	2.4522	-0.6215	0.1441	-0.7700	1.0000
H41- N4 (18- 8)	0.9269	-0.3416	-0.8521	-0.3966	1.0000
H42- N4 (19- 8)	0.8915	0.6299	0.0164	0.7765	1.0000
H5 - N4 (20- 8)	2.6061	0.2900	0.9153	0.2794	1.0000
O4 - O3 (10- 9)	2.2286	-0.5164	0.5783	-0.6316	1.0000
O5 - O3 (11- 9)	3.3960	-0.6475	-0.7489	0.1413	1.0000
N5 - O3 (12- 9)	2.7749	-0.2915	-0.8317	-0.4725	1.0000
C7 - O3 (13- 9)	1.2462	-0.6105	0.1410	-0.7794	1.0000
C8 - O3 (14- 9)	2.4041	-0.5455	-0.4235	-0.7232	1.0000
C9 - O3 (15- 9)	3.2258	-0.4000	-0.9129	-0.0816	1.0000
H3 - O3 (17- 9)	2.9023	-0.2237	0.9462	-0.2339	1.0000
H41- O3 (18- 9)	1.8946	0.2946	0.8461	0.4443	1.0000
H42- O3 (19- 9)	3.3874	0.4240	0.7107	0.5614	1.0000
H81- O3 (22- 9)	2.9721	-0.7668	-0.3439	-0.5420	1.0000
H82- O3 (23- 9)	3.0064	-0.3480	-0.3047	-0.8866	1.0000
H9 - O3 (24- 9)	3.8805	-0.2326	-0.9726	-0.0061	1.0000
H10- O3 (25- 9)	3.2102	-0.0523	-0.8327	-0.5512	1.0000
N5 - O4 (12-10)	3.6141	0.0946	-0.9952	0.0266	1.0000
C7 - O4 (13-10)	1.2575	0.3102	-0.8851	0.3469	1.0000
C8 - O4 (14-10)	2.3362	-0.0687	-0.9875	-0.1418	1.0000
H3 - O4 (17-10)	1.7047	0.2942	0.8549	0.4274	1.0000
H41- O4 (18-10)	2.8423	0.6013	0.1105	0.7913	1.0000
H81- O4 (22-10)	2.5795	-0.4373	-0.8958	-0.0788	1.0000
H82- O4 (23-10)	2.5407	0.0412	-0.8678	-0.4951	1.0000
N5 - O5 (12-11)	2.2792	0.6098	0.1033	-0.7858	1.0000
C7 - O5 (13-11)	3.4009	0.4228	0.7995	-0.4267	1.0000
C8 - O5 (14-11)	2.8346	0.3131	0.5380	-0.7826	1.0000
C9 - O5 (15-11)	1.2404	0.7325	-0.3237	-0.5989	1.0000
H81- O5 (22-11)	2.5866	-0.0310	0.5881	-0.8082	1.0000
H82- O5 (23-11)	3.7240	0.3095	0.4369	-0.8446	1.0000
H9 - O5 (24-11)	1.8569	0.6980	-0.6628	-0.2710	1.0000
H10- O5 (25-11)	3.0331	0.6695	-0.0429	-0.7415	1.0000

Appendiks

BINDING	AVSTAND	$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$	NORM
C7 - N5 (13-12)	2.5072	0.0192	0.9906	0.1356	1.0000
C8 - N5 (14-12)	1.4486	-0.3468	0.8903	-0.2951	1.0000
C9 - N5 (15-12)	1.3175	-0.3653	-0.4835	0.7955	1.0000
H81- N5 (22-12)	1.9759	-0.7440	0.6507	-0.1516	1.0000
H82- N5 (23-12)	1.9563	-0.1213	0.7114	-0.6923	1.0000
H9 - N5 (24-12)	1.9536	-0.0480	-0.7505	0.6591	1.0000
H10- N5 (25-12)	0.8685	0.7380	-0.4207	-0.5276	1.0000
C8 - C7 (14-13)	1.5224	-0.3616	-0.7843	-0.5041	1.0000
C9 - C7 (15-13)	3.2434	-0.1632	-0.9621	0.2183	1.0000
H3 - C7 (17-13)	2.5893	0.0430	0.9927	0.1129	1.0000
H41- C7 (18-13)	2.6577	0.4963	0.5370	0.6822	1.0000
H81- C7 (22-13)	2.0368	-0.7454	-0.5881	-0.3140	1.0000
H82- C7 (23-13)	2.0357	-0.1402	-0.5364	-0.8323	1.0000
H10- C7 (25-13)	3.0174	0.1964	-0.9442	-0.2645	1.0000
C9 - C8 (15-14)	2.4268	0.0087	-0.7939	0.6080	1.0000
H3 - C8 (17-14)	3.9663	0.1669	0.9491	0.2672	1.0000
H81- C8 (22-14)	0.9761	-0.9914	-0.0039	0.1311	1.0000
H82- C8 (23-14)	0.9693	0.2735	0.1053	-0.9561	1.0000
H9 - C8 (24-14)	3.2716	0.1249	-0.8423	0.5243	1.0000
H10- C8 (25-14)	2.0117	0.5683	-0.8227	-0.0153	1.0000
H81- C9 (22-15)	2.5477	-0.3881	0.7547	-0.5289	1.0000
H82- C9 (23-15)	3.1537	0.0774	0.6432	-0.7617	1.0000
H9 - C9 (24-15)	0.9461	0.4096	-0.8764	0.2533	1.0000
H10- C9 (25-15)	1.8979	0.5913	0.1431	-0.7937	1.0000
H3 - H1 (17-16)	3.8995	0.0000	-0.9989	0.0473	1.0000
H6 - H1 (21-16)	2.2777	0.6488	0.0929	0.7553	1.0000
H41- H3 (18-17)	2.2532	0.5359	-0.5073	0.6749	1.0000
H42- H3 (19-17)	3.3352	0.6253	-0.1016	0.7737	1.0000
H42- H41 (19-18)	1.5942	0.5508	0.5046	0.6648	1.0000
H5 - H41 (20-18)	3.5261	0.3041	0.9005	0.3107	1.0000
H5 - H42 (20-19)	2.3791	0.0816	0.9965	0.0151	1.0000
H6 - H5 (21-20)	2.4727	-0.3244	0.8390	-0.4369	1.0000
H82- H81 (23-22)	1.6259	0.7582	0.0651	-0.6487	1.0000
H9 - H81 (24-22)	3.4622	0.3975	-0.7949	0.4584	1.0000
H10- H81 (25-22)	2.6848	0.7863	-0.6150	-0.0591	1.0000
H9 - H82 (24-23)	3.8945	0.0369	-0.7338	0.6784	1.0000
H10- H82 (25-23)	2.1590	0.4068	-0.8138	0.4150	1.0000
H10- H9 (25-24)	2.1908	0.3353	0.5025	-0.7969	1.0000

