

Streszczenie w języku polskim

Równowaga tautomeryczne form aminowych 2,6-diamino-8-azapuryny, 8-aza-izo-guaniny oraz 8-azaguaniny została wyznaczona za pomocą obliczeń DFT na poziomie B3LYP/6311+G(d,p) oraz BHandHLYP/cc-pVTZ. Najbardziej prawdopodobny tautomer 2,6-diamino-8-azapuryny jest protonowany w pozycji N(9), co jest zbieżne z wynikami dostępnymi danymi eksperymentalnymi. Tautomer o najniższej energii swobodnej 8-aza-izo-guaniny jest protonowany w pozycjach N(3) i N(8). W przypadku ważniejszego biologicznie tautomeru N(9)-H prawdopodobieństwo protonacji w pozycji N(3) jest wyższe niż w N(1). Ten wynik, obserwowany również dla izo-guaniny, pokazuje odwrócone prawdopodobieństwo protonacji w pozycjach N(3) i N(1) w porównaniu z guaniną, a więc efekt mutacji izocytozyna->tymina, zaobserwowany dla alternatywnego kodu genetycznego, może również mieć miejsce w przypadku, kiedy izo-guanina zostanie zastąpiona 8-aza-izo-guaniną. Wyraźnie dominującym tautomerem 8-aza-guaniny jest forma uprotonowana w pozycji N(1) oraz N(9), co jest zgodne z wynikami otrzymanymi dla guaniny. Zatem guanina może z powodzeniem zostać zastąpiona przez 8-aza-guaninę, ponieważ nie niesie to ze sobą konsekwencji w postaci zaburzenia interfejsu Watsona-Cricka. Obliczone energie stanów wzbudzonych dla 8-aza-izo-guaniny oraz 2,6-diamino-8-azapuryny pozostają w dobrej zgodności z dostępnymi danymi eksperymentalnymi i wskazują na najbardziej prawdopodobne tautomery, jako te odpowiedzialne za absorpcję.

Obraz tautomeryczny 9-metylo-8-aza-izo-guaniny został zbadany również metodami hybrydowej chemii kwantowej (BHandHLYP/cc-pVTZ) oraz dodatkowo metodami kompozytowymi (G3, G4). Najbardziej dominującymi tautomerami są formy amino-oxo, które są protonowane w pozycjach N(1) i N(3). Ta kolejność dominacji jest zgodna z wynikami tautomerii otrzymanych dla 8-aza-izo-guaniny, ale metylacja badanej cząsteczki powoduje znaczny wzrost populacji form amino-enolowych protonowanych w pozycji O(2). Analiza właściwości elektrostatycznych 9-metylo-8-aza-izo-guaniny pokazuje, że dominujące tautomery mają równomierny rozkład ładunku, ale zdecydowana większość wysokoenergetycznych form protonowanych na pierścieniu triazolowym to cwiterjony.

Fosforylaza nukleozydów purynowych (PNP) jest enzymem, który katalizuje odwracalny proces konwersji (rybozylacja i fosforoliza) między zasadami nukleinowymi (purynami) i ich nukleozydami. Badania eksperymentalne wykazały, że ciążące PNP rybozyluje analogi purynowe w określonych pozycjach - 2,6-diamino-8-azapuryna w pozycjach 7 lub 8 i 8-azaguanina w pozycji 9 pierścienia triazolowego. Przyczyną tego zjawiska może być różna ekspozycja

substratów purynowych na kanał prowadzący do miejsca wiązania. Tę hipotezę zweryfikowano przez zastosowanie technik modelowania molekularnego do dwóch kompleksów analogów purynowych 2,6-diamino-azapuryny - cieleńce PNP (kod pdb: 1LVU) i 8-azaguaniny - cieleńce PNP (kod pdb: 2AI1). Wyniki uzyskane w połączeniu z metodami chemii kwantowej, dokowania i dynamiki molekularnej wykazały jakościową trafność naszej hipotezy. Energie swobodne wiązania układów białko-ligand pokazały, że najbardziej prawdopodobne mody wiązania eksponują azot N(8) w przypadku kompleksu z 2,6-diamino-8-azapuryną i azot N9 dla kompleksu z 8-azaguaniną w kierunku kanału wiążącego, a także wykluczają ekspozycję N9 dla 2,6-diamino-8-azapuryny i N7 dla 8-azaguaniny, co jest częściowo zgodne z danymi eksperymentalnymi. Innym ważnym wynikiem uzyskanym w tym badaniu jest znacznie większa populacja protonowanej formy kluczowej reszty Glu-201 (ze względu na jej obecność w kieszeni wiążącej), w porównaniu ze standardową protonacją niezwiązanego kwasu glutaminowego w roztworze. Wynik ten w połączeniu z populacjami postaci tautomerycznych obu badanych układów silnie sugeruje, że 2,6-diamino-8-azaguanina i 8-azaguanina są rozpoznawane przez białka odpowiednio ze zdeprotonowaną i protonowaną resztą Glu-201. Porównanie wyznaczonych modów wiązania badanych ligandów z inhibitorami obecnymi w strukturach krystalicznych sugeruje, że modyfikacja inhibitora (S)-PMPDAP, w którym łańcuch 2- (fosfometoksy) propylowy jest przyłączony w pozycji 8 zamiast w pozycji 9, może zwiększyć jego powinowactwo wiązania się do białka PNP.

Marek R. A.

Streszczenie w języku angielskim

Tautomeric equilibrium of the 2,6-diamino-8-azapurine, 8-aza-iso-guanine and 8-azaguanine amino forms was determined by DFT calculations at B3LYP/6311+G(d,p) and BHandHLYP/cc-pVTZ level of theory. The most populated tautomer of 2,6-diamino-8-azapurine is protonated at position N(9), which is consistent with the results available from experimental data. The tautomer with the lowest free energy of 8-aza-iso-guanine is protonated at positions N(3) and N(8). In case of the biologically important N(9)-H tautomer, the probability of protonation at the N(3) position is higher than at N(1). This result, also observed for iso-guanine, shows the inverse probability of protonation at positions N(3) and N(1) compared to guanine, and thus the effect of the isocytosine->Thymine mutation, observed for the alternative genetic code, can also occur if iso-guanine is replaced by 8-aza-iso-guanine. The clearly dominant tautomer of 8-aza-guanine is the form protonated at the positions N(1) and N(9), which is consistent with the results obtained for guanine. Therefore, guanine can be successfully replaced by 8-aza-guanine, because it does not affect a Watson-Crick interface. The calculated energies of the excited states for 8-aza-iso-guanine and 2,6-diamino-8-azapurine are in good agreement with available experimental data and indicate the most likely tautomers as those responsible for absorption.

The tautomeric picture of 9-methyl-8-aza-iso-guanine was also examined by hybrid quantum chemistry (BHandHLYP /cc-pVTZ) and additionally by composite methods (G3, G4). The most dominant tautomers are amino-oxo forms that are protonated at positions N(1) and N(3). This order of dominance is consistent with the results of tautomerism obtained for 8-aza-iso-guanine, but the methylation of the molecule under investigation causes a significant increase in the population of amino-enol forms protonated at position O(2). Analysis of the electrostatic properties of 9-methyl-8-aza-iso-guanine shows that the dominant tautomers have uniform distribution of charge, but the vast majority of high-energy forms protonated on the triazole ring are zwitterions.

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) is an enzyme, that catalyzes reversible conversion process (ribosylation and phosphorolysis) between nucleobases (purines) and their nucleosides. Experimental studies showed that *calf* PNP ribosylates purine analogs in specific positions – 2,6-diamino-8-azapurine in positions 7 or 8 and 8-azaguanine in position 9 of the triazole ring. The reason of this phenomena can be a result of different exposition of purine substrates to the channel leading to the binding site. This hypothesis was verified by application of molecular modelling techniques to two complexes of purine analogs 2,6-diamino-azapurine – *calf* PNP and 8-azaguanine – *calf* PNP (pdb-

code: 1LVU and 2AI1, respectively). The results obtained with combination of quantum chemistry, docking and molecular dynamics methods showed qualitative validity of our hypothesis. Binding free energies of protein-ligand systems showed that most probable binding poses expose N8 nitrogen for 2,6-diamino-8-azapurine and N9 nitrogen for 8-azaguanine into the binding channel and ruled out exposition of N9 for 2,6-diamino-8-azapurine and N7 for 8-azaguanine, partially in agreement with the experimental data. The other important result obtained in this study is a significantly higher population of protonated form of crucial residue Glu-201 present in the binding pocket, compared to the standard protonation of free glutamic acid in solution. This result combined with populations of tautomeric forms of both investigated systems strongly suggests that 2,6-diamino-8-azaguanine and 8-azaguanine is recognized by proteins with deprotonated and protonated Glu-201 residue, respectively. Comparison of computed binding poses of the investigated ligands to the inhibitors present in crystal structures suggests that modification of (S)-PMPDAP inhibitor, in which 2-(phosphonomethoxy) propyl chain is attached at position 8 instead of position 9, might increase its binding affinity.

Małgorzata Ryko