

**RECONOCIMIENTO MOLECULAR ENTRE GAGs Y  
PROTEÍNAS EXTRACELULARES.  
ESTUDIOS ESTRUCTURALES MEDIANTE RMN Y  
DINÁMICA MOLECULAR.**

**María José García Jiménez**

## ABREVIATURAS

CS	Chondroitin Sulfate	Sulfato de condroitina
DS	Dermatan Sulfate	Sulfato de dermatano
HS	Heparan Sulfate	Sulfato de heparano
Hp	Heparin	Heparina
KS	Keratan Sulfate	Sulfato de queratano
HA	Hyaluronic Acid	Ácido hialurónico
DCs	Dendritic Cells	Células dendríticas
GAGs	Glicosaminoglycans	Glicosaminoglicanos
SPR	Surface Plasmon Resonance	Resonancia de plasmón superficial
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	Calorimetría de titulación isoterma
FP	Fluorescence Polarization	Polarización de fluorescencia
IC <sub>50</sub>	half maximal Inhibitory Concentration	Mitad de la concentración inhibitoria máxima
RMN		Resonancia Magnética Nuclear
STD	Saturation Transfer Difference	Diferencia de saturación transferida
WaterLOGSY	Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy	Espectroscopía de gradiente observando agua-ligando.
Glide	Grid-based Ligand Docking with Energetic	Docking del ligando basado en un grid energético
S <sup>3</sup> -HMBC	Spin-State-Selective Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Estado de espín selectivo en correlación de enlace múltiple heteronuclear.
MDK	Midkine	Midkina
PTN	Pleiotrophin	Pleiotrofina
FGF-1	Fibroblast Growth Factor	Factor de crecimiento para fibroblastos
XP	Docking Extra Precision	Docking precisión extra
SP	Docking Simple Precision	Docking con precisión simple

## Capítulo 1. Introducción.

1.1	BIOMOLÉCULAS: CARBOHIDRATOS.....	5
1.2	GLICOSAMINOGLICANOS.....	7
1.2.1	Biosíntesis de GAGs.....	7
1.2.2	Tipos de glicosaminoglicanos. ....	10
1.2.2.1	Heparán sulfato y Heparina. ....	10
1.2.2.2	Sulfato de condroitina y Dermatán sulfato.....	11
1.2.2.3	Sulfato de Queratano. ....	12
1.2.2.4	Ácido Hialurónico. ....	12
1.2.3	Funciones de los GAGs.....	13
1.2.3.1	Heparán Sulfato y Heparina. ....	14
2.3.2.1	Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate. ....	15
1.2.4	Estructura química de los GAGs. ....	17
1.3	LECTINAS TIPO C Y FACTORES DE CRECIMIENTO. ....	20
1.3.1.	Lectinas tipo C: Languerina. ....	20
1.3.2.	Factores de crecimiento: FGF1.....	25
1.3.3.	Factores de crecimiento: Midkina y Pleiotrofina. ....	29

## Capítulo 2. Metodología.

2.1	INTRODUCCIÓN.....	36
2.2	MÉTODOS DE RMN PARA EL ESTUDIO DEL LIGANDO LIBRE Y DEL COMPLEJO. ....	36
2.2.1	Obtención de las estructuras tridimensionales del ligando libre de forma experimental. ....	37
2.2.1.1	Experimentos <sup>1</sup> H monodimensionales o S <sup>3</sup> -HMBC. ....	37
2.2.1.2	Experimentos NOESY.....	38
2.2.2	Experimentos para la obtención de las estructuras tridimensionales del ligando asociado de forma experimental. ....	41
2.2.2.1	Efecto Overhauser Nuclear (tr-NOESY). ....	42
2.2.2.2	Diferencia de saturación transferida (STD).....	43
2.2.2.3	T <sub>1</sub> selectivo (relajación longitudinal). ....	46
2.3	MÉTODOS TEÓRICOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL LIGANDO LIBRE Y DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-LIGANDO.....	47
2.3.1	Cálculos computacionales (dinámica molecular) para el estudio teórico de la geometría tridimensional del ligando. ....	47
2.3.2.1	Simulaciones de dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo.....	50
2.3.2	Cálculos teóricos para el estudio teórico de la geometría tridimensional del complejo.....	51
2.3.2.1	Docking. ....	51

2.3.2.2	CORCEMA-ST. ....	55
---------	------------------	----

### **Capítulo 3. Interacción GAGs derivados de Heparina con FGF-1 y Languerina.**

3.1	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS. ....	61
3.2	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL FGF-1 CON TRISACÁRIDOS DERIVADOS DE HEPARINA. ....	67
3.2.1	Experimentos NOESY transferido. ....	68
3.2.2	Experimentos de STD. ....	70
3.2.3	Experimentos T1 selectivo. ....	75
3.2.4	Docking Molecular. ....	77
3.2.5	CORCEMA-ST. ....	83
3.3	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA LANGUERINA Y UN HEXASACÁRIDO (HEXA 4S) DERIVADO DE HEPARINA. ....	86
3.3.1	Estudio tridimensional del hexasacárido libre. ....	86
3.3.2	Estudio estructural del hexasacárido asociado a Languerina. ....	90
3.4	CONCLUSIONES. ....	94
3.5	PARTE EXPERIMENTAL. ....	96
	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. ....	96
	Docking. ....	99
	CORCEMA-ST. ....	99

### **Capítulo 4. Interacción de Midkina con GAGs.**

4.1	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS. ....	102
4.2	ESTUDIO DE LOS TETRASACÁRIDOS LIBRES Y COMPLEJADOS. ....	108
4.2.1	Determinación estructural de los ligandos en su forma libre mediante RMN y dinámica molecular. ....	109
4.2.1.1	Tetrasacáridos dibencilados con tres secuencias diferentes (compuestos 2, 5 y 8) y un tetrasacárido desprotegido con secuencia CS (compuesto 7). ....	109
4.2.1.2	Tetrasacáridos persustituidos con secuencia alternada. Agregación (compuestos 6 y 9). ....	135
4.2.2	Estudio del complejo Midkina-tetrasacárido mediante RMN y docking. .	143
4.2.2.1	Estudio de la interacción entre la Midkina y tetrasacáridos no protegidos (tetrasacáridos 1, 7 y 10). ....	144
4.2.2.2	Estudio de la interacción entre la Midkina y tetrasacáridos dibencilados (2, 5 y 8). ....	156
2.3.2.3	Estudio de la interacción entre la Midkina y los tetrasacáridos perprotegidos. ....	166
4.2.3	Estudio de la interacción de todos los tetrasacáridos mediante experimentos de Polarización de Fluorescencia. ....	168

4.3	ESTUDIO DE LOS DISACÁRIDOS EN SU FORMA LIBRE Y COMPLEJADA.....	169
4.3.1	Estudio estructural de miméticos de CS en su forma libre mediante técnicas de RMN y dinámica molecular.....	170
4.3.1.1	Disacárido 11.....	171
4.3.1.2	Disacárido 12.....	175
4.3.1.3	Disacárido 13.....	180
4.3.1.4	Disacárido 14.....	185
4.3.1.5	Disacárido 15.....	187
4.3.1.6	Pentasacárido 16.....	191
4.3.2	Estudio de los complejos formados por los disacáridos y la midkina mediante RMN y docking. ....	194
4.3.2.1	Complejo formado con el tetrasacárido 11.....	195
4.3.2.2	Complejo formado por el disacárido 12. ....	198
4.3.2.3	Complejo formado con el disacárido 13.....	202
4.3.2.4	Complejo formado por el disacárido 15. ....	206
4.3.3	Datos de inhibición obtenidos por polarización de fluorescencia. ....	210
4.4	CONCLUSIONES.....	210
4.5	PARTE EXPERIMENTAL.....	213
4.5.1	Estudio de los tetrasacáridos libres mediante RMN.....	213
4.5.2	Estudio de los tetrasacáridos complejados mediante RMN.....	215
4.5.3	Estudio de los disacáridos libres mediante RMN.....	216
4.5.4	Estudio de los disacáridos complejados mediante RMN.....	216
4.5.5	Estudio de todos los complejos (disacáridos y tetrasacáridos) mediante docking.....	217
4.5.3.1	Preparación de estructuras.....	217
4.5.3.2	Generación del Grid. ....	217
4.5.3.3	Docking flexible.....	218
4.5.6	Estudio de todos los compuestos (disacáridos y tetrasacáridos) mediante dinámica molecular. ....	218

## Capítulo 5. Interacción de GAGs con Pleiotrofina.

5.1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	221
5.2	DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	224
5.2.1	INTERACCIÓN DE LOS TETRASACÁRIDOS NO PROTEGIDOS CON LA PLEIOTROFINA (3, 7 Y 10).....	224
5.2.2	INTERACCIÓN DE LA PLEIOTROFINA CON TETRASACÁRIDOS DIBENCILADOS (2, 5 Y 8). ....	234
5.3	DATOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS MEDIANTE POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA. ....	244
5.4	CONCLUSIONES.....	245

5.5	PARTE EXPERIMENTAL.....	246
-----	-------------------------	-----

**Capítulo 6. Conclusiones.**

6.1	INTERACCIÓN DE GAGs DERIVADOS DE HEPARINA CON FGF-1 Y LANGUERINA.....	249
-----	-----------------------------------------------------------------------	-----

6.2	INTERACCIÓN DE GAGs (TETRASACÁRIDOS Y DISACÁRIDOS) CON MIDKINA. ....	250
-----	----------------------------------------------------------------------	-----

6.3	PLEIOTROFINA .....	252
-----	--------------------	-----

Anexo.....	259
------------	-----

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción**



## 1.1 BIOMOLÉCULAS: CARBOHIDRATOS.

Además de la evidente y bien conocida función como fuente de energía de los carbohidratos (glucosa y almidón / glucógeno) estas biomoléculas también juegan un papel importante como constituyentes estructurales en diferentes organismos en distintos reinos (quitina o celulosa). Sin embargo, un nuevo campo está surgiendo con ímpetu y está relacionado con el papel que juegan los carbohidratos dentro de la glicobiología donde intervienen en numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos. Como procesos fisiológicos se puede mencionar el desarrollo, crecimiento, diferenciación, reconocimiento y embriogénesis celular y como procesos patológicos los procesos infecciosos, de inflamación y tumorales. Estos procesos pueden provocar modificaciones postraduccionales de las proteínas regulando así su actividad biológica.<sup>1</sup> La glicobiología comprende el estudio de la estructura molecular y función biológica de los carbohidratos libres o presentes en glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos, así como de las proteínas que interactúan específicamente con estos<sup>2</sup> y su implicación causal en el desarrollo de patologías, diagnosis y terapia.<sup>1</sup>

En las células de los mamíferos se pueden encontrar diferentes tipos de monosacáridos tales como la Glucosa (Glc), la Galactosa (Gal), la N-acetil galactosamina (GalNAc), la N-acetil glucosamina (GlcNAc), la Xilosa (Xyl), el Ácido Glucurónico (GlcA), la Mannosa (Man), la Fucosa (Fuc) y el Ácido Siálico o el Ácido N-acetilneuraminico (NeuAc).<sup>3</sup>

Estos monosacáridos se pueden unir formando disacáridos y moléculas más complejas como oligosacáridos y polisacáridos. Debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos que presentan pueden formar tanto estructuras lineales como ramificadas. Además, estas moléculas pueden sufrir modificaciones posteriores como sulfataciones, fosforilaciones, acetilaciones aumentando así su diversidad estructural y, con frecuencia, se pueden encuentran en combinación con otras biomoléculas.

En la naturaleza hay diferentes tipos de biomoléculas tales como los ácidos nucleicos (ADN y ARN), las proteínas, los lípidos y los glúcidos siendo este último grupo el tipo más abundante. El conjunto de todos los carbohidratos tanto libres como formando

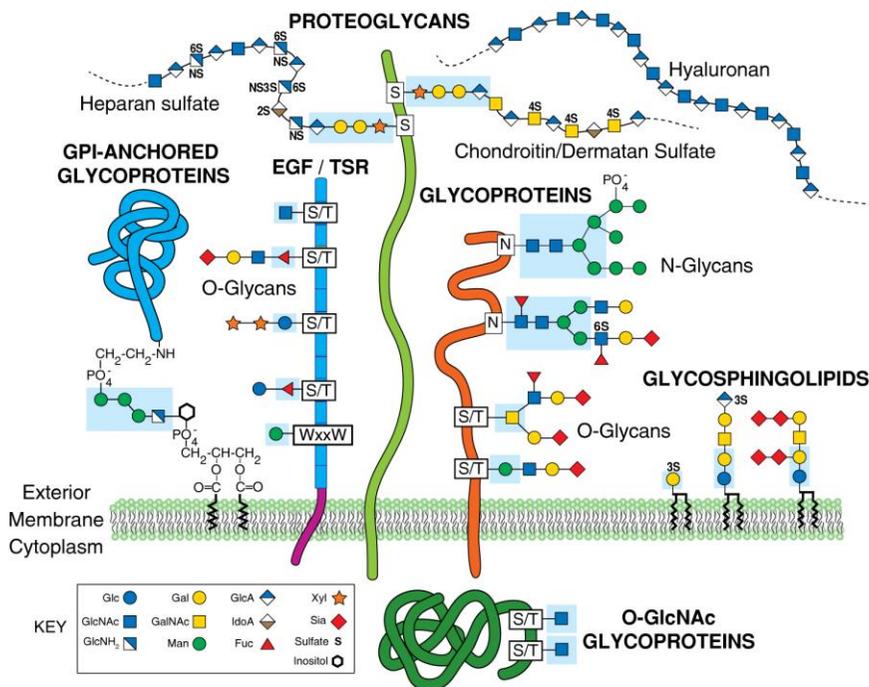
---

<sup>1</sup> A. Varki, *Glycobiology* **2017**, 27, 3.

<sup>2</sup> Y. C. Lee, R. T. Lee, *Accounts of Chemical Research* **1995**, 28, 321.

<sup>3</sup> A. A. Weiss, S. S. Iyer, *Microbe* **2007**, 2, 489.

moléculas más complejas, que se encuentran en el organismo forman el glicoma. El estudio del glicoma es mucho más complejo que el estudio del proteoma (estudio estructural y funcional de proteínas), del genoma (estudio del ADN) y del lipidoma (estudio de las membranas lipídicas). Esta complejidad radica en la gran diversidad de carbohidratos existentes en la naturaleza, a la multitud de enlaces que se producen entre ellos (formando carbohidratos lineales o ramificados) y a su asociación a diversas proteínas. En concreto, los glicosaminoglicanos (GAGs) se encuentran en la matriz extracelular de las células eucariotas formando glicoconjugados con proteínas denominados proteoglicanos (**figura 1.1.1**).



**Figura 1.1.1** Presentación de los carbohidratos en la matriz extracelular. Fuente: A. Varki, S. Kornfeld, 2017.<sup>4</sup>

Los glicoconjugados se pueden clasificar dependiendo del sitio y modo de unión a la membrana plasmática en proteoglicanos, glicoproteínas y glicosfingolípidos. Los proteoglicanos (PGs) son polisacáridos lineales, GAGs, unidos a proteínas mediante

<sup>4</sup> A. Varki, S. Kornfeld, *Essential of Glycobiology* 2017, Capítulo 1.

uniones covalentes a través de un átomo de oxígeno con un aminoácido, la Serina. Las glicoproteínas están formadas por carbohidratos ramificados siendo estos N-glicanos u O-glicanos y por proteínas. Dentro de este grupo también encontramos la glucosamina N acetilada unida a residuos de Serina o Treonina. Los glicosfingolípidos están formados por glicosaminoglicanos unidos a lípidos de membrana. Y por último, el GPI (glicosil fosfatidil inositol) que se une a proteínas que se anclan a la membrana mediante lípidos.<sup>1</sup> Debido a la gran diversidad de glicoconjugados presentes en la matriz extracelular, en ella, se llevan a cabo muchas funciones relativas a las células.

Los carbohidratos están involucrados en diferentes funciones biológicas como el reconocimiento en el crecimiento axonal, coagulación de la sangre, reconocimiento célula-célula, interacciones antígeno-anticuerpo, actúan como un factor estructural en matrices extra-celulares y llevan a cabo las modificaciones post-translacionales de péptidos. Además, para que las células lleven a cabo sus funciones de forma normal se necesita unos patrones de glicosidación correctos, ya que lo contrario provocaría desastres humanos.<sup>1,5</sup>

## 1.2 GLICOSAMINOGLICANOS.

Los GAGs como ya se ha mencionado, son polisacáridos lineales que se encuentran en la matriz extracelular<sup>6</sup> y en la membrana plasmática. Están formados por unidades disacáridicas básicas (dos anillos de hexopiranosas) que se repiten a lo largo de la cadena. Los GAGs más comunes en vertebrados e invertebrados son la heparina, el sulfato de heparano, el sulfato de condroitina, el sulfato de dermatano, el sulfato de queratano y el ácido hialurónico.<sup>7</sup>

### 1.2.1 Biosíntesis de GAGs.

La biosíntesis de los GAGs se produce en el aparato de Golgi. De forma general, la biosíntesis de los diferentes tipos de GAGs comienza con un paso común, la formación de una secuencia oligosacáridica bien lineal o ramificada unida al núcleo de las

---

<sup>5</sup> A. Varki, P. Gagneux, *Essentials of carbohydrates* **2017**, capítulo 7.

<sup>6</sup> A. Köwitsch, G. Zhou, T. Groth, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2018**, *12*, e23.

<sup>7</sup> S. Yamada, K. Sugahara, S. Özbek, *Communicate and Integrative Biology* **2011**, *4*, 150.

proteínas. Según el tipo de GAG que se esté biosintetizando tanto la secuencia como la proteína núcleo pueden ser diferentes.<sup>8</sup>

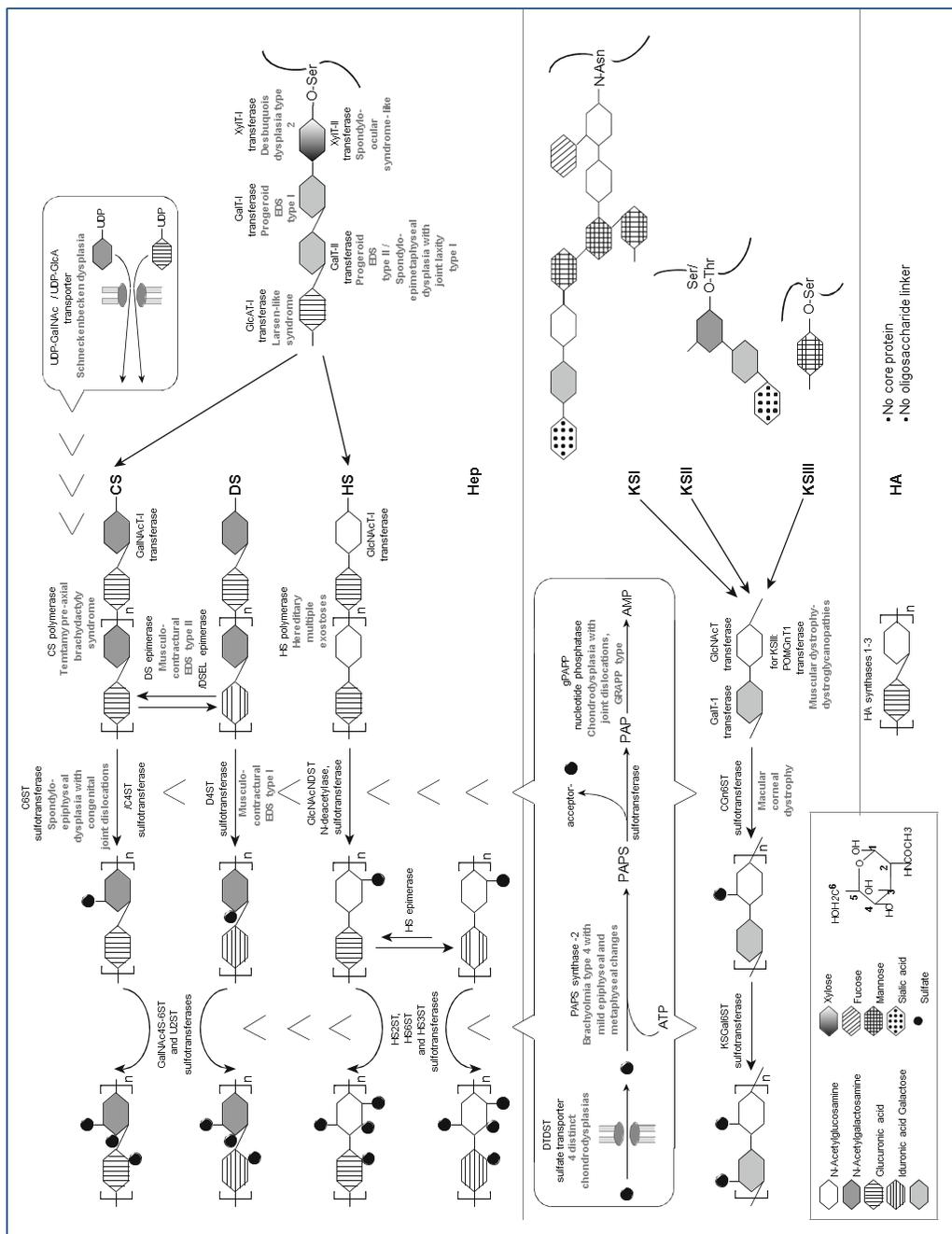
En el caso de la biosíntesis del *Sulfato de condroitina (CS, del inglés Chondroitin sulfate)*, del *Sulfato de dermatano (DS, del inglés Dermatan Sulfate)*, del *Sulfato de heparano (HS, del inglés heparan sulfate)* y de la *Heparina (Hp, del inglés heparin)* el aminoácido núcleo utilizado es la Serina y se produce una secuencia tetrasacarídica común a todos. Esta secuencia es Xyl-Gal-Gal-GlcA cuyos monosacáridos están unidos entre sí por enlaces  $\beta$  (1,3 y 1,4). En este proceso intervienen las transferasas, enzimas que actúan en la formación de la secuencia tetrasacarídica. La unión del quinto residuo determina la formación de los diferentes disacáridos.<sup>8</sup> El proceso de sulfatación es llevado a cabo por las sulfotransferasas enzimas que transfieren los sulfatos desde las PAPS a las posiciones específicas en la secuencia disacáridica. Cabe mencionar que el DS y la Hp se produce por una epimerización del carbono en posición 5 del *Ácido glucurónico (GlcA, del inglés Glucuronic Acid)* presente en el HSGAG y en el CSGAG convirtiéndolo en *Ácido idurónico (IdoA, del inglés Iduronic Acid)*.

Para la biosíntesis del *Sulfato de queratano (KS, del inglés Keratan Sulfate)*, la secuencia oligosacarídica es diferente a la formada en los tres GAGs ya mencionados. Esta secuencia puede ser ramificada usando Asn o Ser/Thr como núcleo a la proteína o lineal usando Serina como aminoácido para la unión a la proteína formando así tres clases de KSGAG.

Por último, el *ácido hialurónico (HA, del inglés Hialuronic Acid)* es un tipo especial de glicosaminoglicano que no se sintetiza de igual forma que los demás. Para su formación no se necesita una secuencia oligosacarídica y por lo tanto, tampoco es necesario una proteína núcleo. Su biosíntesis comienza desde el final no reductor en la membrana plasmática.

---

<sup>8</sup> F. Sasarman, C. Maftai, P. M. Campeau, C. B. Guitton, G. A. Mitchell, P. Allard, *Journal Inherit Metab Dis.* **2016**, *39*, 173.



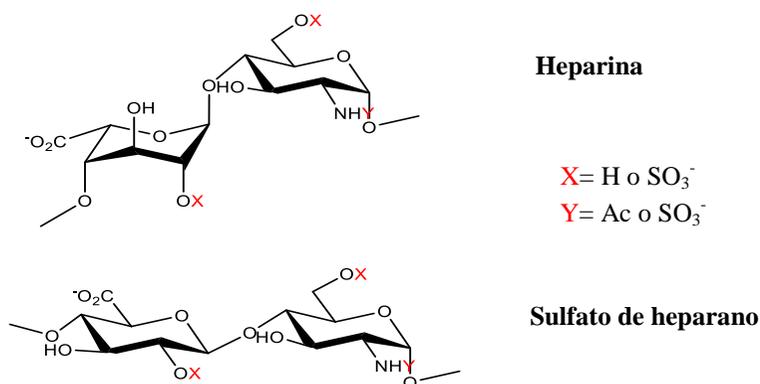
**Figura 1.2.1** Biosíntesis de los diferentes GAGs que podemos encontrar en la naturaleza. Fuente: Florin Sasarman, Catalina Maftei et al. 2016.<sup>8</sup>

## 1.2.2 Tipos de glicosaminoglicanos.

De forma general, los GAGs están formados por repeticiones de unas secuencias disacáridicas básicas. Este disacárido de repetición está formado por dos anillos de hexapiranosos. Un anillo es el ácido Urónico (ácido  $\alpha$ -L-idurónico o ácido  $\beta$ -D-glucurónico) y una hexosamina (N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina o N-acetil- $\beta$ -D-galactosamina).

### 1.2.2.1 Heparán sulfato y Heparina.

La secuencia disacáridica básica para la formación del sulfato de heparano es la formada por un residuo de  $\alpha$ -D glucosamina N-acetilada y el ácido  $\beta$ -D glucurónico mediante uniones 1,4. Si se produce una epimerización del carbono 5 del residuo del ácido glucurónico obtenemos el ácido  $\alpha$ -L idurónico y por lo tanto, la secuencia disacáridica de la heparina. Como se puede observar en la **figura 1.2.2.1**, tanto las posiciones X como Y pueden estar sulfatadas por lo que el patrón de sulfatación en estos dos disacáridos es muy elevado siendo los glicosaminoglicanos con más carga negativa.<sup>9,10</sup>



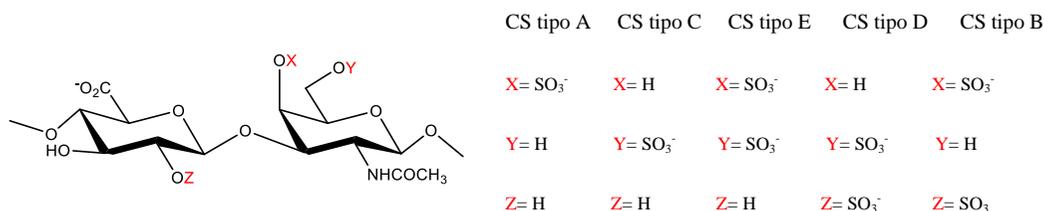
**Figura 1.2.2.1** Secuencia disacáridica básica para la formación de oligosacáridos derivados de Hp y HS.

<sup>9</sup> D. Soares da Costa, R. L. Reis, Iva. Pashkuleva, *The Annual Review of Biomedical Engineering* **2017**, *19*, 1.

<sup>10</sup> R. Sasisekharan, G. Venkataraman, *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 626.

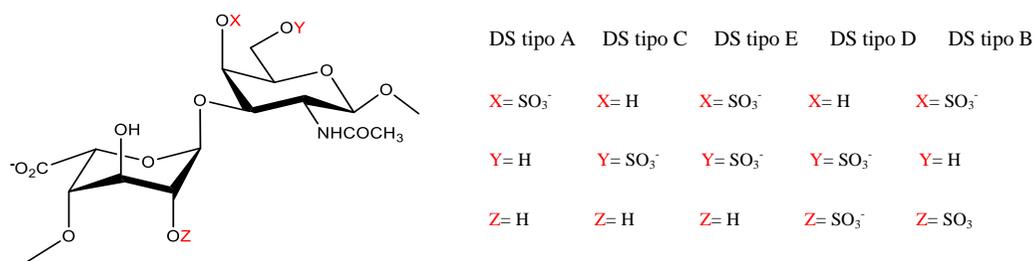
### 1.2.2.2 Sulfato de condroitina y Dermatán sulfato.

El sulfato de condroitina consiste en un disacárido formado por la  $\beta$ -D galactosamina N-acetilada y el ácido  $\beta$ -D glucurónico. Las uniones ente ellos son  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,3 como se puede observar en la **figura 1.2.2.2**. Según el patrón de sulfatación obtenemos diferentes derivados de este glicosaminoglicano según las sulfotransferasas que actúan en el proceso de biosíntesis.<sup>9</sup>



**Figura 1.2.2.2** Diferentes tipos de CS en función de su patrón de sulfatación.

La secuencia disacáridica básica del sulfato de dermatano es la misma que la del sulfato de condroitina pero con una variación ya que se produce una epimerización del anillo de GlcA obteniendo el IdoA variando la proporción de este dependiendo de la alta o baja expresión de las dos epimerasas que actúan en el proceso. También existen diferentes tipos en función del patrón de sulfatación (**figura 1.2.2.3**).



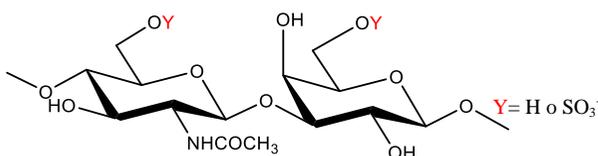
**Figura 1.2.2.3** Diferentes tipos de DS en función de su patrón de sulfatación.

Este tipo de glicosaminoglicano se encuentra en los tejidos de los mamíferos, sobretodo en la piel pero también puede encontrarse en los tendones, en las válvulas del corazón, en la sangre y en los pulmones. Interviene en muchas enfermedades cardiovasculares, infecciones, tumorigénesis, fibrosis, etc.<sup>8</sup> Además, actúa como anticoagulante igual que

la heparina ya que un hexasacárido de sulfato de dermatano puede enlazar con el cofactor II de la heparina inhibiendo la actividad de la trombina.

### 1.2.2.3 Sulfato de Queratano.

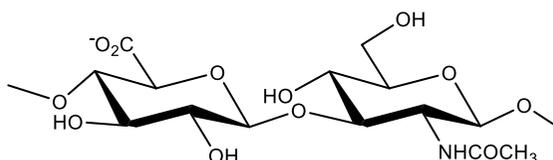
Este disacárido está formado por una  $\beta$ -D galactosa y la  $\beta$ -D glucosamina N-acetilada que se unen mediante enlaces  $\beta$  1,3 y  $\beta$  1,4 (**figura 1.2.2.4**).<sup>8</sup> El grado de sulfatación y la longitud en este GAG puede variar pero las dos acciones se producen en el mismo grado. Como ya se ha mencionado la zona común con la que empieza la biosíntesis es diferente, lo que provoca que haya tres tipos de sulfato de queratano con localizaciones en el organismo diferentes. El Tipo I que se encuentra en la córnea, el tipo II que se encuentra en el cartílago y, por último, el tipo III que se encuentra en el cerebro.<sup>8,9</sup>



**Figura 1.2.2.4** Secuencia disacárida básica del sulfato de queratano (KS).

### 1.2.2.4 Ácido Hialurónico.

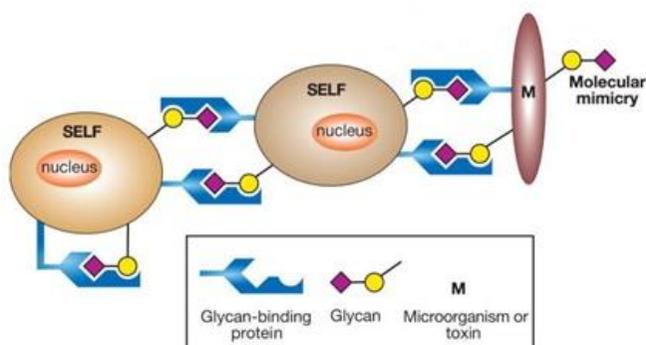
Esta secuencia está formada por el ácido  $\beta$ -D glucurónico y una  $\beta$ -D glucosamina N-acetilada unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1 (**figura 1.2.2.5**). Otra diferencia de este disacárido con los demás, es que no presenta grupos sulfato. Es ampliamente distribuido por los tejidos neuronales, epiteliales y conectivos e interviene en la proliferación, en la migración celular y en la progresión de algunos tumores.



**Figura 1.2.2.5** Secuencia disacárida básica del ácido hialurónico.

### 1.2.3 Funciones de los GAGs.

Los GAGs son biomoléculas que llevan a cabo numerosos procesos biológicos (fisiológicos y patológicos) además de funciones estructurales y moduladoras. Una clasificación que se puede hacer de las funciones biológicas de los glicosaminoglicanos es según la forma en que reconocen a diferentes proteínas. Así la **figura 1.2.3.1** muestra dos formas de reconocimiento. Por un lado, se puede producir un reconocimiento intrínseco por el cual reconocen proteínas procedentes del mismo organismo y por otro lado, un reconocimiento extrínseco reconociendo proteínas procedentes de un organismo diferente. Para que se produzca este reconocimiento se necesita una proteína que reconozca a glicosaminoglicanos (GBP).



**Figura 1.2.3.1** Reconocimiento intrínseco (izquierda) y reconocimiento extrínseco (derecha) desde la célula central. Fuente: Ajito Varki y Pascal Garneo 2007.<sup>5</sup>

Según su función estructural se puede enumerar varios procesos biológicos en los que intervienen los GAGs:<sup>1,8,9,11,12,13</sup>

- Intervienen en la elasticidad, resiliencia y compresibilidad de los tejidos.
- Contribuyen a la solubilidad de las proteínas glicosiladas del plasma sanguíneo.

---

<sup>11</sup> K. Sugahara, H. Kitagawa, *Currante Opinion in Structural Biology* **2000**, 10, 518.

<sup>12</sup> T. Mikami, H. Kitagawa, *Glycoconjugate Journal* **2017**, 34, 725.

<sup>13</sup> Y. Mechref, D. Muddiman, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017**, 409, 355.

- Contribuyen al plegamiento de los polipéptidos que se encuentran en el lumen del Retículo Endoplásmico y protegen a las proteínas de la ruptura de los enlaces glicosídicos.
- Inhiben las interacciones célula-célula o célula-matriz gracias a su carga negativa.
- Actúan como fuente de energía debido al almacenamiento de glucosa en células animales y en plantas.

Debido a la gran cantidad de funciones que los GAGs pueden realizar en el organismo, estos polisacáridos son muy útiles como aplicación médica por su efecto anticoagulante, anti-inflamatorio, como agentes antitumorales entre otros.<sup>6</sup>

En los siguientes apartados se va a enumerar algunas de las interacciones de los GAGs (que se han estudiado en esta tesis doctoral) con diversas proteínas y las funciones biológicas en las que intervienen estas biomoléculas debido a las interacciones.

### 1.2.3.1 *Heparán Sulfato y Heparina.*

HSPGs interactúan con diferentes proteínas en la membrana extracelular realizando así diversas funciones.<sup>10,14,15</sup> Estas proteínas pueden ser factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, enzimas, inhibidores enzimáticos y proteínas de la matriz extracelular. A continuación se describen algunas de las funciones del HS:

- Estos GAGs pueden actuar como correceptores uniéndose a receptores tipo FGF o VEGF ayudando a la formación del complejo proteína-ligando o modificando la estructura de ambos o sólo de uno de ellos para que se puede formar el complejo provocando el inicio del proceso de señalización de los FGs. Los glicosaminoglicanos de heparán sulfato secretados también provocan una respuesta de señalización en células cercanas.
- Otra función en la que participan estos proteoglicanos es la de intervenir en el enlace de los factores de crecimiento a la membrana extracelular provocando así la regulación de la migración celular por parte de la matriz extracelular.

---

<sup>14</sup> S. Sarrazin, W.C. Lamanna, J.D. Esko, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2011**, 3, 1.

<sup>15</sup> R. Raman, V. Sasisekharan, R. Sasisekharan, *Chemistry and Biology*, **2005**, 12, 267.

- Los morfógenos también son moléculas de señalización expresados en un tejido. Estos forman unos gradientes morfogénicos que son esenciales para llevar a cabo la diferenciación celular. Para la estabilización de estos gradientes y evitar su difusión se requieren glicosaminoglicanos tales como el HS. Dado que muchos ligandos proteicos, como factores de crecimiento, morfógenos y citoquinas, están implicados en la progresión del tumor, es cada vez más evidente que los proteoglicanos de la superficie celular afectan el comportamiento de las células tumorales.<sup>16</sup>
- También actúan como receptores de adhesión uniéndose a proteínas de la matriz o de la superficie celular tales como fibronectinas, lamininas, vitronectinas, trombospondina y algunos colágenos fibrilares. Además de intervenir en la adhesión celular también facilitan el proceso de adhesión célula-célula.
- HS puede regular la regeneración, mantenimiento y reparación de los tejidos de un tipo determinado de células debido a su unión a factores de crecimiento llevando éstas a cabo su función de mantenimiento y regulación.
- Otra función de la heparina muy conocida es su función anticoagulante debido a su intervención en la unión entre la trombina y la antitrombina III acelerando así el proceso de inhibición de la trombina evitando problemas de la coagulación sanguínea.
- Los patógenos como las bacterias, virus y parásitos utilizan los receptores de glicosaminoglicanos de la superficie celular para infectar a la célula.

#### 2.3.2.1 *Condroitín Sulfato y Dermatán Sulfato.*

Este tipo de glicosaminoglicano se localiza en la matriz extracelular del sistema nervioso central en vertebrados,<sup>17</sup> bien en la superficie o asociado a la membrana plasmática. Además, se puede encontrar en el cartílago de los mamíferos llevando a

---

<sup>16</sup> J. R. Couchman, H. Multhaupt, R. D. Sanderson, *F1000 Faculty Reviews* **2016**, *5*, 1541.

<sup>17</sup> L. Djerbal, H. Lortat-Jacob, JCF. Kwok, *Glycoconjugate Journal* **2017**, *34*, 363.

cabo funciones estructurales. Como los demás glicosaminoglicanos, éste también interacciona con diferentes proteínas llevando a cabo numerosos procesos fisiológicos y patológicos.<sup>18-19,20,21</sup>

Algunas de las funciones que podemos mencionar son:

- El CS puede participar en el proceso de osteoartritis.<sup>22</sup>
- Otra función más estudiada del CS es su interacción y cooperación con proteínas y receptores de señalización extracelular modulando el crecimiento axonal. Más específicamente, el CS puede interactuar con factores neurotróficos, factores de crecimiento de fibroblastos, midkina y pleiotrofina llevando a cabo procesos relacionados con las células neuronales (diferenciación, adhesión, migración, crecimiento, etc.). Todas las variantes del CS según el patrón de sulfatación muestran interacción con factores de crecimiento y factores neurotróficos. Además el híbrido CS/DS también puede interactuar con factores de crecimiento igual que lo hace la Hp o CS.

Debido a la gran demanda de GAGs para fines terapéuticos es necesaria la síntesis química de estos productos con nuevas estrategias y grupos protectores para obtener GAGs con un alto grado de estereoselectividad y quimioselectividad necesarios para la interacción proteína-ligando.<sup>23</sup> Además, el patrón de sulfatación de dichos productos regula una gran variedad de interacciones proteína-ligando y la caracterización a nivel molecular de estas interacciones son de gran importancia para el conocimiento de actividades biológicas llevadas a cabo por GAGs.

---

<sup>18</sup> J. Sugahara, T. Mikami, T. Uyama, S. Mizuguchi, K. Nomura, H. Kitagawa, *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, *13*, 612.

<sup>19</sup> C. D. Nandini, K. Sugahara, *Advances in Pharmacology* **2006**, *53*, 253.

<sup>20</sup> R. M. Lauder, *Complementary Therapies in Medicine* **2009**, *17*, 56.

<sup>21</sup> J. M. Trowbridge, R. L. Gallo, *Glycobiology* **2002**, *12*, 117R.

<sup>22</sup> Y. Henrotin, M. Marty, A. Mobasher, *Maturitas* **2014**, *78*, 184.

<sup>23</sup> M. Mende, C. Bednarek, M. Wawryszyn, P. Sauter, M. B. Biskup, U. Schepers, S. Bräse, *Chemical Reviews* **2016**, *116*, 8193.

### 1.2.4 Estructura química de los GAGs.

La estructura de un disacárido, oligosacárido o polisacárido es determinada por la secuencia monosacáridica, por la disposición de los enlaces glicosídicos y la estereoquímica de las uniones glicosídicas ( $\alpha$  o  $\beta$ ) y por el grado y tipo de sustitución de los grupos hidroxilos.

Como ya se ha mencionado, las hexosas son anillos de hexapiranosas que pueden mostrar diferentes conformaciones incluso sufrir un equilibrio conformacional como ocurre para el IdoA por diferentes efectos.<sup>24,25,26</sup> En 1975, Cremer and Pople pusieron de manifiesto una definición para describir los parámetros que proporcionan las conformaciones canónicas para un monosacárido.<sup>27</sup> Estos parámetros representan un conjunto esférico tal que un punto P viene definido por Q,  $\theta$  y  $\varphi$  siendo Q el radio de la esfera,  $\theta$  es el ángulo polar que indica si la conformación está en el norte, en el sur o en el ecuador de la esfera y  $\varphi$  es el ángulo azimutal el cual indica donde nos encontramos dentro del ecuador de la esfera (**figura 1.2.4.1**).

En el norte y sur de la esfera nos encontramos las conformaciones de silla perfectamente definidas ( ${}^4C_1$  y  ${}^1C_4$ ), en el ecuador nos encontramos las conformaciones de Bote (B) o bote torcido (S) y entre el ecuador y los polos nos encontramos las conformaciones de media silla (H) o de medio bote (E).<sup>28</sup> La **figura 1.2.4.1 b** representa el diagrama de pseudorrotación en el que se puede observar las diferentes conformaciones.

---

<sup>24</sup> B. M. Satelle, S. U. Hansen, J. Gardiner, A. Almond, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 13132.

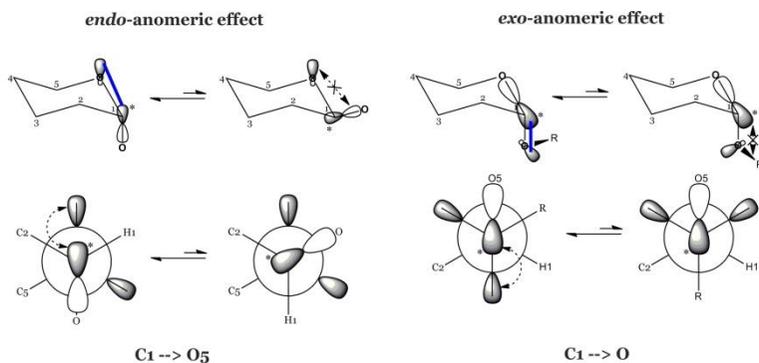
<sup>25</sup> T. R. Rudd, M. A. Skidmore, M. Guerrini, M. Hricovini, A. K. Powell, G. Siligardi y E. A. Yates, *Current Opinion in Structural Biology* **2010**, 20, 567.

<sup>26</sup> M. Hricovini, *The Journal of Physical Chemistry* **2011**, 115, 1503.

<sup>27</sup> D. Cremer, J. A. Pople, *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97, 1354.

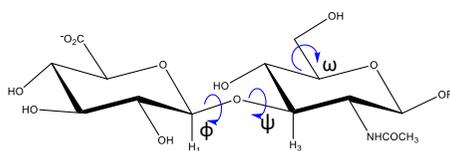
<sup>28</sup> G. A. Jeffrey, J. H. Yates, *Carbohydrate Research* **1979**, 74, 319.





**Figura 1.2.4.2** Representación del efecto endo y exo de un anillo de hexopiranos en su conformación  ${}^4C_1$ .

Los glicosaminoglicanos tienen una gran flexibilidad conformacional debido a las uniones glicosídicas y a la rotación del grupo hidroxilo en posición C6 del anillo de hexoxamina. Estas uniones están definidas por tres ángulos de torsión tales como  $\varphi$ ,  $\psi$  y  $\omega$ .<sup>29</sup> En la **figura 1.2.4.3** se puede observar los diferentes enlaces en un disacárido de CS. Se puede definir  $\Phi$  como el ángulo formado entre  $H_1-C_1-O_g-C_x$  ( $C_x$  es el Carbono del anillo anterior que participa en el enlace glicosídico),  $\Psi$  es el ángulo formado entre  $C_1-O_g-C_x-H_x$  ( $H_x$  es el hidrógeno unido a  $C_x$ ) y  $\omega$  es el ángulo definido entre  $C_4-C_5-C_6-O_6$  que nos da información de la rotación del grupo hidroxilo unido al C5 del anillo. Así, podemos tener tres diferentes rotámeros (gauche-gauche, gauche-trans y trans-gauche).



**Figura 1.2.4.3** Representación de los diferentes ángulos diedros que definen la conformación de los glicosaminoglicanos en un enlace 1,3.

Todas estas características estructurales de los glicosaminoglicanos se pueden determinar mediante la aplicación de la espectroscopía de  ${}^1H$ -RMN midiendo las constantes de acoplamiento  ${}^3J_{HH}$  y comparándolas con las típicas de cada conformación y las distancias experimentales calculadas a partir de las interacciones dipolo-dipolo (NOEs) que nos dan información adicional de la conformación de cada anillo y de las

orientaciones de los ángulos diedros glicosídicos. Esta metodología es aplicada para GAGs libres independientemente de su origen y complejidad y al estudio de su asociación con otras especies como proteínas.<sup>30</sup>

### 1.3 LECTINAS TIPO C Y FACTORES DE CRECIMIENTO.

Como ya se ha mencionado los GAGs se asocian a numerosas proteínas en la matriz extracelular modificando o interviniendo en sus funciones. Estas uniones se producen por interacciones no covalentes entre la proteína y el ligando tales como interacciones electrostáticas debido a los aminoácidos cargados positivamente de las proteínas. También se pueden producir interacciones hidrófóbicas con los residuos aromáticos de las proteínas, puentes de hidrógeno o interacciones de Van der Waals. Esta tesis está centrada en el estudio de la asociación de GAGs con proteínas diferentes, bien factores de crecimiento o lectinas tipo-C: Langerina, FGF-1, Midkina y Pleiotrofina, por lo que se va a explicar brevemente la estructura y función de cada una de ellas.

#### 1.3.1. Lectinas tipo C: Langerina.

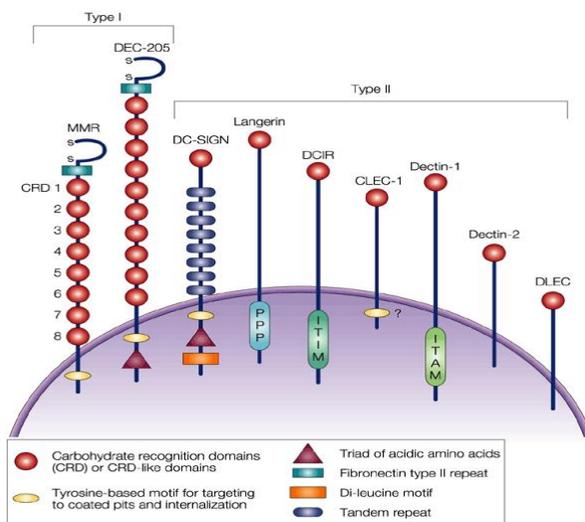
Las lectinas son proteínas de unión a carbohidratos q intervienen en procesos de reconocimiento de GAGs con alta especificidad, a nivel celular y molecular a través de un Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos (DRC). Las lectinas tipo C son proteínas que necesitan  $Ca^{2+}$  para ejercer su función y complejar selectivamente oligosacáridos. Suelen estar asociadas al sistema inmune, pivotando el primer proceso de reconocimiento celular sobre estas.

Entre las lectinas de tipo C más conocidas se encuentran las expresadas por las células dendríticas (*DCs*, del inglés *dendritic cell*) denominadas DC-SIGN. Estas células forman parte esencial del sistema inmunitario encontrándose en la piel y en la mucosa en mamíferos.

Las DCs expresan diferentes proteínas transmembranales (tipos I y II) en la matriz extracelular (**figura 1.3.1.1**). La diferencia entre ambos tipos radica en la cantidad de dominios de reconocimiento de carbohidratos que presentan.<sup>31</sup>

---

<sup>30</sup> J. F. G. Vliegthart, *Perspectives in Science* **2017** 11, 3.



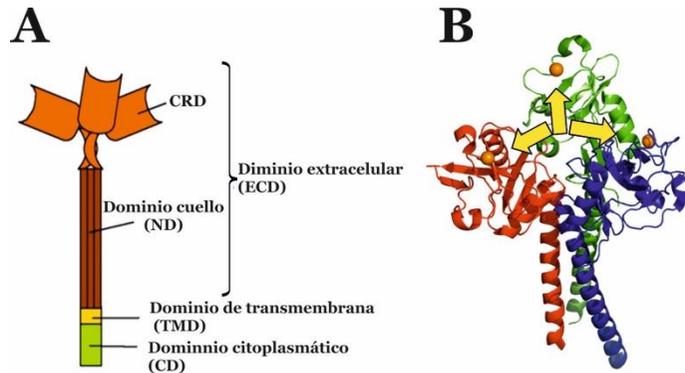
**Figura 1.3.1.1** Representación de las diferentes Lectinas tipo C en la superficie celular de la célula dendrítica. Fuente: Carl G. Figdor et al. 2002.<sup>31</sup>

Centrándonos en la Langerina, es una lectina tipo C expresada por un subconjunto de las células dendríticas, las células de Langerhans (*LCs*, del inglés *Langerhans cell*)<sup>32</sup> que se encuentran principalmente en la epidermis de la piel. Para llevar a cabo este reconocimiento la Langerina presenta un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Esta proteína presenta varios dominios cuya ordenación se puede ver en la **figura 1.3.1.2**. Los tres dominios son: un dominio intracelular (citoplasmático) formado por 43 aminoácidos acabando con un N-terminal, un dominio transmembranal formado por 20 aminoácidos y un dominio extracelular más largo (ECD) acabado con un C-terminal. El dominio citoplasmático está formado por un motivo de señalización rico en prolina, el cual funciona como un sitio de unión para proteínas de transducción de señales. El dominio extracelular está subdividido en un dominio de reconocimiento de carbohidratos y un cuello muy largo, una secuencia peptídica en forma de hélice alfa. El CRD presenta una secuencia de Glutamato/Prolina/Asparagina formando un patrón EPN, el cual es característico de lectinas con especificidad en manosa. Este dominio CRD es capaz de reconocer carbohidratos interviniendo en procesos biológicos como adhesión célula-célula y célula-matriz. Por último, la Langerina presenta un dominio particular localizado entre el CRD y el dominio de transmembrana, una secuencia de

<sup>31</sup> C. G. Figdor, Y. van Kooyk, G. J. Adema, *Nature Reviews Immunology* **2002**, 2, 77.

<sup>32</sup> M. Merad, F. Ginhoux, M. Collin, *Nature Reviews Immunology* **2008**, 8, 935.

repetición de leucinas, “una cremallera de leucina”. Esta secuencia permite la trimerización de las cadenas de hélices alfas que forman el cuello de la Langerina formando el trímero de la estructura de dicha proteína.<sup>33</sup>



**Figura 1.3.1.2** A) Estructura de la Langerina con sus diferentes dominios. B) Representación de la estructura de la Langerina en su forma secundaria. Las flechas indican los tres Ca<sup>2+</sup> procedentes de cada una de las cadenas de Langerina (PDB código 3KQG).

En las lectinas tipo C, actúan de igual forma que las células dendríticas internalizando los patógenos a través de su reconocimiento de manosa, fucosa, glucosa u otros tipos de carbohidratos. Cada lectina tipo C reconoce a diferentes tipos ligandos lo cual conlleva asociado una función. Por ejemplo, la DC-SIGN interviene en el procesado del virus del VIH-1 a través de la glicoproteína gp-120. Dentro del mismo sistema, la Langerina, presente en las células de Langerhans que se encuentran en la epidermis, también enlaza al virus del VIH a través del reconocimiento de diferentes estructuras de carbohidratos como manosa, fucosa, glucosa, etc.<sup>34,35,36</sup> Sin embargo, este reconocimiento permite la internalización, degradación y presentación del antígeno correspondiente a través de unos orgánulos denominados de Birbeck (**figura 1.3.1.3 b**).<sup>37,38</sup> Se pueden nombrar

<sup>33</sup> J. Valladeau, C. Dextrutter-D'Ambuyante, S. Saeland, *Immunologic Research* **2003**, 28, 93.

<sup>34</sup> L. de Witte, A. Nabatov, M. Pion, D. Fluitsma, M. AWP de Jong, T. de Gruijl, V. Piguët, Y. van Kooyk, T. B. H. Geijtenbeek, *Nature Medicine* **2007**, 13, 367.

<sup>35</sup> I. M. Dambuzá, B. D. Brown, *Current Opinion Immunology* **2015**, 32, 21.

<sup>36</sup> A. M. Kerrigan, G. D. Brown, *Immunobiology* **2009**, 214, 562.

<sup>37</sup> T. B. H. Geijtenbeek, S. I. Gringhuis, *Natural reviews Immunology* **2002**, 9, 465.

diferentes procesos en los que intervienen las lectinas tipo C como pueden ser en la metástasis del tumor<sup>39</sup> y la infección del sistema inmune por el VIH<sup>34</sup><sup>40</sup> y el VSH.<sup>41</sup>

Para comprender mejor el proceso de la Langerina en la infección por el virus del VIH tenemos que conocer como este virus puede interactuar con la célula hospedadora. Se conocen diferentes mecanismos de infección:

- Por el reconocimiento de receptores CD<sup>4+</sup> de los linfocitos y de co-receptores CCR5 y CXCR4 de las citoquinas de las células T provocando la fusión del virus a la membrana de la célula hospedadora. La célula viral contiene en su superficie glicoproteínas tales como gp41 y gp120 que son las responsables del proceso de reconocimiento debido a su cambio conformacional cuando se unen a los receptores de las células infectadas.
- Mediante endocitosis después de que se produzca el reconocimiento entre el virus y la DC-SIGN. Ésta proteína puede almacenar las partículas virales en sus compartimentos multivesiculares<sup>42</sup> para producir la infección de las células dendríticas o enlaza a los virus en la superficie celular protegiéndolos de su degradación. Además, el virus expuesto en la superficie interactúa con los receptores CD4, CCR5 de las células T.<sup>41</sup>

Las células de Langerhans, que expresan Langerina, se encuentran en el epitelio de la célula por lo que es la primera barrera para los virus. Inmediatamente debajo, en el subepitelio se sitúan las células dendríticas, que contienen en su membrana tetrámeros de DC-SIGN. Si bien, ambas interactúan con carbohidratos relacionados con infecciones víricas en el caso de la Langerina tras la internalización los patógenos son dirigidos a los gránulos de Birbeck donde son procesados (**figura 1.3.1.3**) y cuya función es la degradación del virus del VIH y eliminación,<sup>33</sup> mientras que en el caso de

---

<sup>38</sup> J. Valladeau, O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Bincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque, S. Saeland, *Immunity* **2000**, *12*, 71.

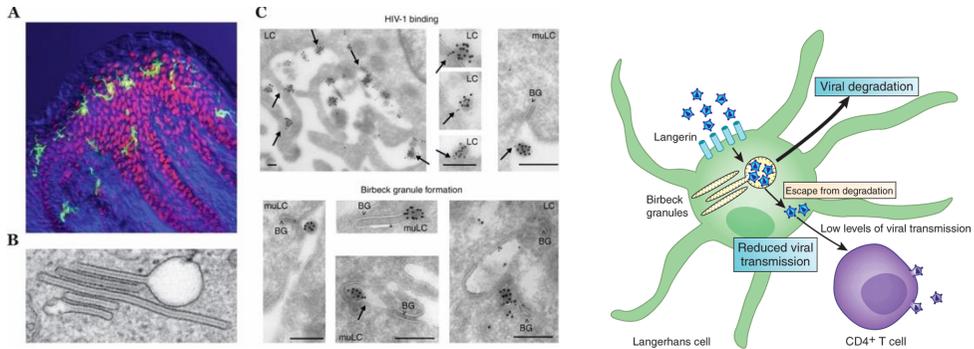
<sup>39</sup> D. Ding, Y. Yao, S. Zhang, C. Su, Y. Zhang, *Oncology letters* **2017**, *13*, 13.

<sup>40</sup> E. Chabrol, M. Thépaut, C. Dezutter-Dambuyant, C. Vives, J. Marcoux, R. Kahn, J. Valladeau-Guilemond, P. Vachette, D. Durand, F. Fieschi, *Biophysical Journal* **2015**, *108*, 667.

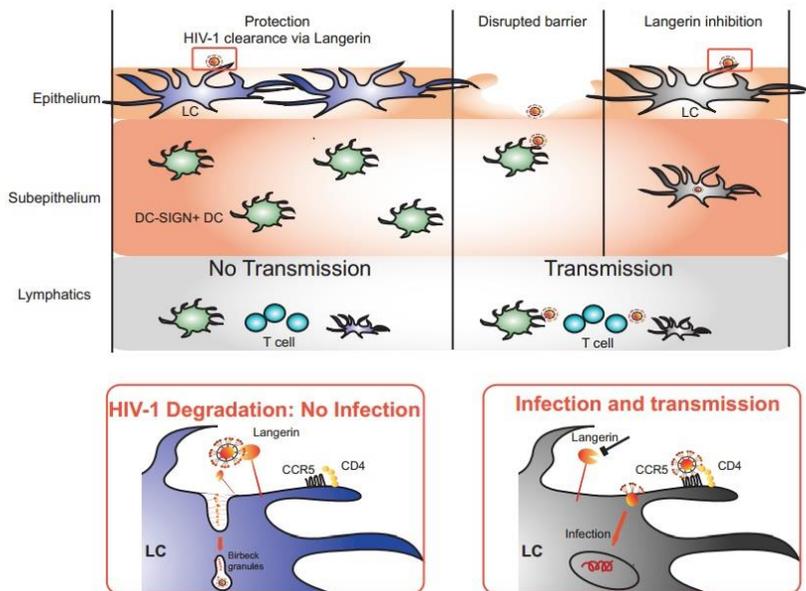
<sup>41</sup> R. A. Botting, H. Rana, K. M. Bertram, J. W. Rhodes, H. Baharlou, N. Nasr, A. L. Cunningham, A. N. Harman, *Reviews in Medical Virology* **2017**, *27*, e1923.

<sup>42</sup> T. B. H. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. Van Vliet, G. C. F. Fan Duijnhoven, J. Middel, I. L. M. H. A. Cornelissen, H. S. L. M. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, Y. Van Kooyk, *Cell* **2000**, *100*, 575.

la CD-SIGN pueden actuar como puerta trasera favoreciendo la infección (figura 1.3.1.4).



**Figura 1.3.1.3** Representación de una célula dendrítica y funcionamiento de la Langerina durante el virus del VIH. Fuente: A y B, Schwartz



**Figura 1.3.1.4** Proceso de infección o degradación del virus del VIH.

Se debe de clarificar la gran importancia que presenta el reconocimiento de GAGs por parte de la Langerina para poder llevar a cabo su función de degradación del VIH. Este reconocimiento y por supuesto, la interacción Langerina-GAGs está controlados por diversos factores. Podemos mencionar la longitud de la cadena de GAGs, el patrón de

sulfatación y ya unión mediante el catión  $\text{Ca}^{2+}$ . Por eso en la presente tesis doctoral se va a presentar una parte de un capítulo en el que se muestra la disponibilidad de la Langerina para presentar un reconocimiento mediante  $\text{Ca}^{2+}$  o simplemente reconoce al GAG sin necesidad de dicho ión.

### 1.3.2. Factores de crecimiento: *FGF1*.

En el organismo se producen diferentes procesos fisiológicos y patológicos llevados a cabo por procesos de señalización celular de los que podemos destacar la regulación de la actividad de la antitrombina inhibiendo la coagulación sanguínea, la señalización de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos, la adhesión celular, la modulación de citoquinas y quimioquinas y la infección por bacterias y virus.

Tanto las citoquinas como los factores de crecimiento son proteínas de señalización celular. Los factores de crecimiento son muy versátiles (PDGF, EFG, TGF, FGF, NGF, IGF y eritropoyetina) y, por lo tanto, llevan a cabo diversas funciones.

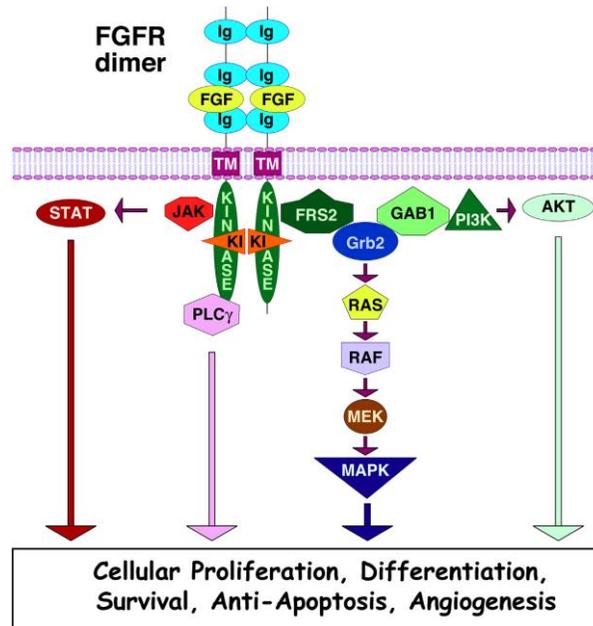
Si nos centramos en los factores de crecimiento de fibroblastos (*FGFs*, del inglés *Fibroblastos Growth Factors*) son glicoproteínas que se encuentran en la membrana celular del epitelio. En la actualidad, se pueden encontrar 18 tipos diferentes de *FGFs* y 5 receptores de factores de crecimiento de fibroblastos (*FGFRs*, del inglés *Fibroblastos Growth Factors Receptors*) en las células de los mamíferos.<sup>43</sup> En esta tesis se van a estudiar la interacción de GAGs con una de ellas, el FGF-1.

El FGF-1 y el FGF-2 presentan una alta homología tanto en secuencia como en estructura tridimensional. Sin embargo, presentan diferencias en la formación del complejo terciario y por tanto, diferencias en la interacción con los glicosaminoglicanos debido al patrón de sulfatación de estos (al menos hasta donde las técnicas estructurales permiten determinar). De tal forma que, para que se produzca la interacción entre el FGF-2 y el HSPG es necesario un sulfato encontrado en posición 6 del anillo de glucosamina del HSPGs.

---

<sup>43</sup> C. J. Powers, S.W. McLeskey, A. Wellstein, *Endocrine-Related Cancer* **2000**, 7, 165.

Estos FGFs participan en diversas funciones biológicas como la proliferación celular, la diferenciación celular y la angiogénesis. Además, puede intervenir en el desarrollo de los tumores.<sup>44-45,46</sup>



**Figura 1.3.2.1** Representación de los FGFRs en la superficie celular en forma de dímero. Representación de la zona de transmembrana y citoplasmática. Esta última lleva a cabo los diferentes procesos celulares.

Para que los FGFs ejerzan su función biológica necesitan ser activados interaccionando con sus receptores de tipo tirosina quinasa (FGFRs) (**figura 1.3.2.1**). Estos receptores presentan varios residuos de tirosina quinasa en su dominio citoplasmático, los cuales, se dimerizan y se autofosforilan. Esta dimerización provoca cambios conformacionales de la proteína objetivo resultando la activación de varias actividades catalíticas. Además, estos receptores también presentan dominios extracelulares (I, II y III) los

<sup>44</sup> P. Gerwins, E. Sköldenberg, L. Claesson-Welsh, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2000**, *34*, 185.

<sup>45</sup> Z. K. Otrrock, R. A. R. Mahfouz, J. A. Makarem, A. I. Shamseddine, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **2007**, *39*, 212.

<sup>46</sup> P. Khosravi Shaki, A. Soria Lovelle, G. Pérez Manga, *Clinical and Translational Oncology* **2009**, *11*, 138.

cuales intervienen en la interacción con FGFs, con GAGs y en su propia dimerización. Un tema de gran interés es la influencia de GAGs en la formación de dímeros de FGFRs y FGFs.

Una de las hipótesis iniciales era que el GAGs actuaba como unión entre FGF y su FGFR formando un complejo 1:1:1 (**figura 1.3.2.2\_E y F**). Así esta biomolécula provocaba la activación del FGF reconociendo a su FGFR. Otro modelo es la dimerización de FGF estabilizado por GAG y si unión a su FGFR formando el complejo 2:1:1 (**figura 1.3.3.2\_A y B**).

Estas dos formas de unión entre FGF:FGFR:HS pueden evolucionar y formar un complejo terciario en el que está incluido el FGF-1, su receptor de tirosina quinasa (FGFR) y el GAG que se encuentra en la matriz extracelular del endotelio.<sup>47</sup> Así mediante estudios de Rayos X se llegó a obtener dos estructuras cristalinas de dos complejos terciarios formados con diferente estequiometría. Para un complejo la estequiometría fue 2:2:2 (**figura 1.3.2.2\_H**) para el caso de la unión del FGF-2 y su FGFR1<sup>48</sup> (complejo simétrico). Para el otro complejo la estequiometría es 2:2:1 (**figura 1.3.2.2\_D**) para el caso del FGF-1 y su FGFR2<sup>49</sup> (complejo asimétrico). Para la formación de este último complejo se encontró que el HS fue favorecido para interactuar con monómeros del FGF por lo tanto, para este complejo se forma por un mecanismo de cooperatividad para formar la dimerización del FGF con una cadena de heparan sulfato.<sup>50</sup> Además, se han llevado a cabo bastantes estudios acerca de la oligomerización cis o trans a partir de los datos termodinámicos y estequiometría del complejo terciario. Estos datos sugieren que el FGF-1 enlaza a Hp mediante una dimerización en cis.<sup>51</sup>

---

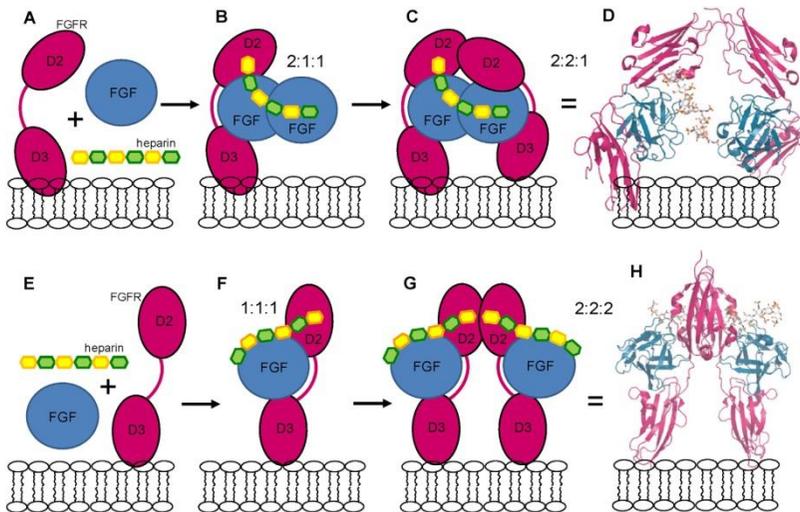
<sup>47</sup> V. H. Pomin, *Biochimie* **2016**, *127*, 214.

<sup>48</sup> J. Schlessinger, A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahimi, A. V. Eliseenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Linhardt, M. Mohammadi, *Molecular Cell* **2000**, *6*, 743.

<sup>49</sup> L. Pellegrini, D. F. Burke, F. von Delft, B. Mulloy, T. L. Blundell, *Nature* **2000**, *407*, 1029.

<sup>50</sup> C. J. Robinson, N. J. Harmer, S. J. Goodger, T. L. Blundell, J. T. Gallagher, *Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 42274.

<sup>51</sup> A. Brown, C. J. Robinson, J. T. Gallagher, T. L. Blundell, *Biophysical Journal* **2013**, *104*, 1720.



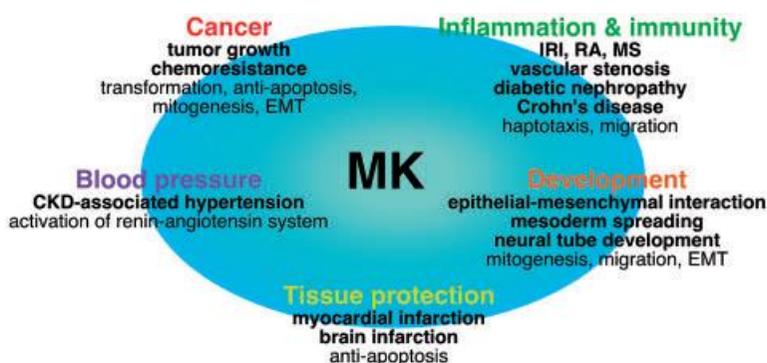
**Figura 1.3.2.2** A, B y C muestra el proceso de formación del complejo terciario asimétrico y E, F, G muestra el proceso de formación del complejo terciario simétrico. Fuente: Vitor H. Pomin 2016.<sup>47</sup>

Un aspecto muy importante que cabe mencionar es la especificidad del GAG de unión para la formación del complejo terciario. Parece que el HS y la Hp son los GAGs responsables de enlazar y regular la actividad de los diferentes FGFs.<sup>52</sup> Entre ambos, la Hp presenta más cargas negativas por lo que se usa para el estudio del complejo terciario de los FGFs. De esta manera, se producen interacciones de tipo electrostático entre estas cargas negativas y positivas de la proteína estabilizando el complejo terciario. Además, el complejo terciario también está estabilizado por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre el FGF y los dominos D2 y D3 de sus receptores.<sup>48-49</sup> Para que se produzca la interacción de GAGs con los FGFs y además que debido a esta interacción los FGFs presenten actividad biológica se debe de tener en cuenta las características conformacionales del enlace. Por ejemplo, la estructura mínima del GAGs en cuestión, necesaria para el enlace, la flexibilidad conformacional que pueden sufrir los anillos de IdoA presentes en los GAGs (HS y Hp) y el patrón de sulfatación de estas biomoléculas, son aspectos muy importantes en la formación del complejo terciario. Estos aspectos pero con más detalle serán comentados en el capítulo referido a la interacción del FGF-1 con trisacáridos derivados de Hp (capítulo 3).

<sup>52</sup> M. Mohammadi, S. K. Olsen, R. Goetz, *Currente Opinion in Structural Biology* **2005**, *15*, 506.

### 1.3.3. Factores de crecimiento: Midkina y Pleiotrofina.

Midkina es un factor de crecimiento con gran cantidad de aminoácidos básicos y cisteína. Esta proteína se une a GAG y está presente en todos los vertebrados donde se expresa a mitad de la gestación. Su expresión, salvo excepciones, está relacionado con procesos patológicos, cáncer, inflamación, la presión sanguínea, el desarrollo y la protección de tejidos.<sup>53-54,55</sup> Los inhibidores de la Midkina<sup>56</sup> también son importantes en la esclerosis múltiple y en enfermedades como el Alzheimer (**figura 1.3.3.1**). Además, la Midkina puede presentar diferentes funciones dependiendo de la célula objetivo.



**Figura 1.3.3.1** Representación de diferentes funciones biológicas en las que interviene la Midkina. Fuente: Kenji Kadomatsu et al. 2013.<sup>53</sup>

Algunos de los receptores de la midkina pueden ser PTP, un proteoglicano, LRP una lipoproteína y ALK una quinasa linfoma anaplastia (esquema de la unión a diferentes receptores)<sup>53</sup>. La **figura 1.3.1.2** representa la unión de esta proteína con alguno de sus receptores.

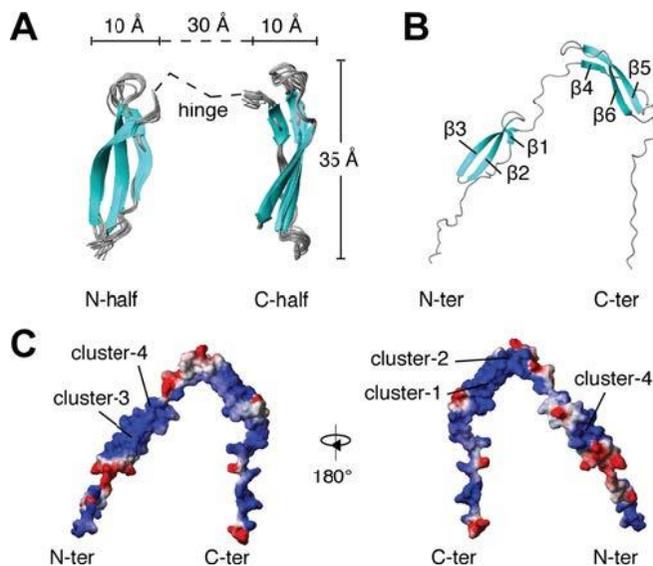
<sup>53</sup> K. Kadomatsu, S. Kishida, S. Tsubota, *J.Biochem* **2013**, *153*, 511.

<sup>54</sup> T. Muramatsu, *Current Pharmaceutical Design* **2011**, *17*, 410.

<sup>55</sup> K. Kadomatsu, T. Muramatsu, *Cancer Letters* **2004**, *204*, 127.

<sup>56</sup> T. Matsui, K. Ichihara-Tanaka, C. Lan, H. Muramatsu, T. Kondou, C. Hirose, S. Sakuma, T. Muramatsu, *International Archives of Medicine* **2010**, *3*.

Esta proteína está formada por dos cadenas y una zona muy conservada en la estructura “la zona hinge”. Ver figura 1.3.10 A. Una cadena está formada por un dominio C con una cola C terminal y la otra cadena está formada por un dominio N y una cola N-terminal. Estas dos cadenas están unidas por una zona hinge. La estructura secundaria de las dos cadenas son láminas B antiparalelas con tres puentes disulfuros en el dominio N y dos puentes en el dominio C. Además, el dominio C contiene un círculo “loop” flexible. En el dominio C la midkina presenta dos zonas de reconocimiento de carbohidratos. Una zona, cluster-1, formada por residuos de lisina (K79 y K87) y por una arginina (R81). El cluster-2 se encuentra en el loop flexible formado por la lisina (K86 y K87) y por una arginina (R89).<sup>57</sup> El dominio N terminal es requerido para la dimerización de la Midkina junto con la transglutaminasa y la heparina. Estudios posteriores llevados a cabo con un pentasacárido de heparina (fondaparium) y la Mdkb presente en el pez zebra, han sugerido dos zonas más en la estructura de la proteína, capaces de unirse a carbohidratos. Estas dos zonas (cluster-3 y cluster-4) se encuentran en el dominio N-terminal de la proteína (ver estructura 1.3.11 B y C). Así mediante técnicas de resonancia han concluido la necesidad de las 4 zonas (2 de cada dominio) y la zona hinge para la unión del pentasacárido de heparina.<sup>58</sup>



<sup>57</sup> W. Iwasaki, K. Nagata, H. Hatanaka, T. Inui, T. Kimura, T. Muramatsu, K. Yoshida, M. Tasumi, F. Inagaki, *The EMBO Journal* **1997**, *16*, 6936.

<sup>58</sup> J. Lim, S. Yao, M. Graf, C. Winkler, D. Yang, *Biochemical Society* **2013**, *451*, 407.

**Figura 1.3.3.2** Representación de la estructura de la Midkina. En A) podemos observar la estructura secundaria de la midkina y la zona hinge. En B y C se representa la estructura secundaria con una superficie electrostática para poder observar los 4 clúster formados de aminoácidos positivos (azul). Fuente:Jackwee Lim et al. 2013.<sup>58</sup>

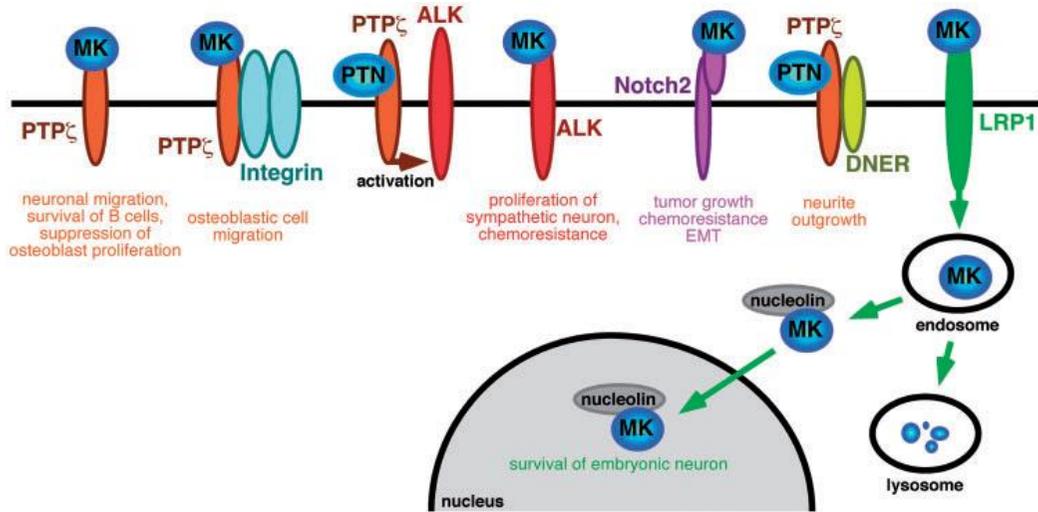
A pesar de haberse resuelto la estructura de la Midkina completa mediante RMN y parcial por difracción de rayos X, la naturaleza precisa del complejo de membrana a través del cual activa su función permanece por descubrir. En general, estos procesos implican la oligomerización extracelular del receptor al formar el complejo con factores de crecimiento y el GAG. Dicha oligomerización produce una señal intracelular frecuentemente por fosforización que es la responsable de la actividad. GAGs tipo heparina interacciona con la Midkina debido a su estructura tridimensional y la disposición de los grupos cargados negativamente.<sup>57</sup> Otro tipo de GAG que también interacciona con la Midkina es el CS tipo E.<sup>59</sup> En el capítulo 4 se describe un estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral. Este estudio trata sobre las interacciones de GAGs con la Midkina debido a la gran importancia que este tema presenta. Así que se comentará los en contexto los antecedentes previos a este tipo de interacciones y se pondrá de manifiesto los requisitos estructurales para la interacción con HS O CS-GAG.

La Midkina puede unirse a sus diferentes receptores, como ya se ha mencionado, formando un complejo proteína-receptor. Por ejemplo, un receptor es PTP que es un proteoglicano encontrado en la superficie celular. Este presenta tres zonas diferenciadas en su estructura: un dominio extracelular formado por cadenas de CS, una zona de transmembrana y un dominio citoplasmático. Mediante este dominio extracelular se puede producir la interacción entre la Midkina y el PTP provocando la activación de la Midkina. Esta estimulación provoca la fosforilación de las tirosinas que se encuentran en la zona citoplasmática del receptor provocando el inicio del sistema de señalización transfiriendo la señal a dos quinasas tipo MAP y PI3. La unión a los receptores provoca diferentes funciones.<sup>53</sup><sup>60</sup> (**figura 1.3.3.3**).

---

<sup>59</sup> P. Zou, K. Zou, H. Muramatsu, K. Ichihara-Tanaka, O. Habuchi, S. Ohtake, S. Iematsu, S. Sakuma, T. Muramatsu, *Glycobiology* **2003**, *13*, 35.

<sup>60</sup> T. Muramatsu, *Journal of Biochemistry* **2002**, *132*, 359.



**Figura 1.3.3.3** Proceso llevado a cabo por la Midkina cuando es activada por sus receptores.  
Fuente: Kenji Kadomatsu et al. 2013.<sup>53</sup>

Bastante parecida a la estructura de la Midkina es la Pleiotrofina (PTN). Esta proteína también es un factor de crecimiento neuronal el cual presenta una similitud con la proteína de un 45% y un plegamiento similar. Esta proteína es una potente citoquina mitogénica la cual presenta diversas funciones en la superficie celular. Por ejemplo, las células cancerígenas presentan una alta expresión de esta proteína cuyos niveles dependen de la metástasis del tumor.<sup>61,62,63,64,65,66,67,68,69</sup> Por el contrario, una alta

<sup>61</sup> M. Hatziapostolou, J. Delbe, P. Katsoris, C. Polytarchou, J. Courty, E. Papadimitriou, *Prostate* **2005**, 65, 151.

<sup>62</sup> R. Jager, K. Noll, K. Havemann, K. H. Pfluger, C. Knabbe, H. Rauvala, G. Zugmaier, *International Journal of Cancer* **1997**, 73, 537.

<sup>63</sup> R. Mentlein, J. Held-Feindt, *Journal of Neurochemistry* **2002**, 83, 747.

<sup>64</sup> F. Vacherot, D. Caruelle, D. Chopin, S. Gil-Diez, D. Barritault, J. P. Caruelle, J. Courty, *Prostate* **1999**, 38, 126.

<sup>65</sup> A. Wellstein, W. J. Fang, A. Khatri, Y. Lu, S. S. Swain, R. B. Dickson, J. Sasse, A. T. Riegel, M. E. Lippman, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 2582.

<sup>66</sup> L. Zhang, T. Mabuchi, E. Satoh, S. Maeda, H. Nukui, H. Naganuma, *Neurologia Medico Chirurgica (Tokyo)* **2004**, 44, 637.

<sup>67</sup> N. Zhang, R. Zhong, Z. Y. Wang, T. F. Deuel, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 16733.

<sup>68</sup> D. Weber, H. J. Klomp, F. Czubayko, A. Wellstein, H. Juhl, *Cancer Research* **2000**, 60, 5284.

<sup>69</sup> Y. Kong, P. S. Bai, K. J. Nan, H. Sun, N. Z. Chen, X. G. Qi, *International Journal of Colorectal Disease* **2012**, 27, 287.

expresión de estas proteínas en otro tipo de células ayuda al mantenimiento de células, reparación de tejidos y protección de células neuronales durante su adición.<sup>70,71,72,73,74,75,76</sup> Además, esta proteína participa en el desarrollo del sistema nervioso central y en la reparación y regeneración de tejidos.<sup>77,78,79</sup>

La estructura de la Pleiotrofina no se encuentra tan definida como la estructura de la Midkina (**figura 1.3.3.4**). La distribución de aminoácidos básicos en el NTD de la Pleiotrofina es diferente a la Midkina. La Pleiotrofina presenta un clúster de aminoácidos básicos en el extremo NTD similar a la Midkina del pez “zebra” pero con un aminoácido adicional, R39.<sup>80,81</sup>

---

<sup>70</sup> E. Gramage, G. Herradon, Y. B. Martin, M. Vicente-Rodriguez, L. Rojo, H. Gnekow, A. Barbero, C. Perez-Garcia, *Toxicology* **2013**, 306, 2147.

<sup>71</sup> G. Herradon, C. Perez-Garcia, *British Journal of Pharmacology* **2014**, 171, 837.

<sup>72</sup> M. Vicente-Rodriguez, E. Gramage, G. Herradon, C. Perez-Garcia, *Toxicology* **2013**, 314, 166.

<sup>73</sup> E. Gramage, G. Herradon, *Current Pharmaceutical Design* **2011**, 17, 449.

<sup>74</sup> G. Herradon, L. Ezquerro, *Current Medicinal Chemistry* **2009**, 16, 3322.

<sup>75</sup> D. M. Marchionini, E. Lehrmann, Y. Chu, B. He, C. E. Sortwell, K. G. Becker, W. J. Freed, J. H. Kordower, *Brain Research* **2007**, 1147, 77.

<sup>76</sup> I. R. Taravini, M. Chertoff, E. G. Cafferata, J. Courty, M. G. Murer, F. J. Pitossi, O. S. Gershanik, *Molecular Neurodegeneration* **2011**, 6, 40.

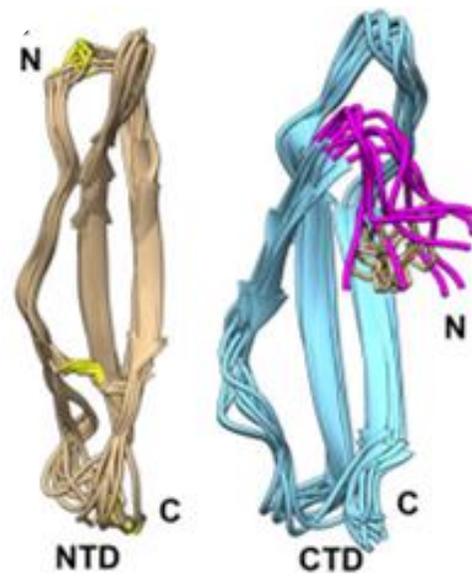
<sup>77</sup> H. J. Yeh, Y. Y. He, J. Xu, C. Y. Hsu, T. F. Deuel, *Journal of Neuroscience* **1998**, 18, 3699.

<sup>78</sup> Y. S. Li, P.G. Milner, A.K. Chauhan, M.A. Watson, R.M. Hoffman, C.M. Kodner, J. Milbrandt, T.F. Deuel, *Science* **1990**, 250, 1690.

<sup>79</sup> H. A. Himburg, J. R. Harris, T. Ito, P. Daher, J. L. Russell, M. Quarmyne, P. L. Doan, K. Helms, M. Nakamura, E. Fixsen, G. Herradon, T. Reya, N. J. Chao, S. Harroch, J. P. Chute, *Cell Reports* **2012**, 2, 964.

<sup>80</sup> W. Iwasaki, K. Nagata, H. Hatanaka, T. Inui, T. Kimura, T. Muramatsu, K. Yoshida, M. Tasumi, F. Inagaki, *The EMBO Journal* **1997**, 16, 6936.

<sup>81</sup> E. Ryan, D. Shen, X. Wang, *The FEBS Journal* **2016**, 283, 1488.



**Figura 1.3.3.4** Estructura de la Pleiotrofina, extremo N y C reductor de los dos dominios. Fuente: Eathen Ryan et al. 2016. Fuente: Eathen Ryan, 2016.

## **CAPÍTULO 2**

### **Metodología**

## 2.1 INTRODUCCIÓN.

Los procesos fisiológicos llevados a cabo en las células se basan en el reconocimiento molecular proteína-ligando. Para conocer las bases estructurales de dicho reconocimiento molecular es de gran importancia determinar las interacciones proteína-ligando establecidas por las fuerzas intermoleculares entre ambas especies.<sup>1,2,3</sup>

El estudio de los complejos proteína-ligando se ha abordado con una amplia selección de técnicas biofísicas tales como SPR (*del inglés, Surface Plasmon Resonance*) que permite obtener parámetros cinéticos de interacción, ITC (*del inglés, Isothermal Titration Calorimetry*) que mide propiedades termodinámicas del enlace y FP (*del inglés, Fluorescence Polarization*) que proporciona el porcentaje de inhibición (IC<sub>50</sub>) indicando la efectividad de una sustancia para inhibir una función biológica. Además, se utilizan técnicas computacionales como las dinámicas moleculares y docking de las que se puede obtener la estructura tridimensional de los ligandos libres y de los complejos, respectivamente. Finalmente, se ha de mencionar las técnicas de RMN<sup>4,5</sup> (*Resonancia Magnética Nuclear*), y de difracción de rayos X que proporcionan la estructura atómica del complejo.<sup>6</sup>

En este capítulo se va a describir la metodología aplicada durante el desarrollo de esta tesis doctoral para el estudio de la interacción proteína-ligando empleando técnicas de Resonancia Magnética Nuclear y métodos teóricos.

## 2.2 MÉTODOS DE RMN PARA EL ESTUDIO DEL LIGANDO LIBRE Y DEL COMPLEJO.

Dependiendo de las características espectroscópicas de cada biomolécula los procedimientos para la determinación de sus estructuras tridimensionales son diferentes. Para el caso de los carbohidratos el más empleado es la combinación de datos

---

<sup>1</sup> N. Sharon, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282, 2753.

<sup>2</sup> W. I. Weis, K. Drickamer, *Annual Review of Biochemistry* **1996**, 65, 441.

<sup>3</sup> R. U. Lemieux, *Accounts of Chemical Research* **1996**, 29, 373.

<sup>4</sup> B. Meyer, T. Peters, *Adgewnadte Chemie* **2003**, 42, 864.

<sup>5</sup> L. Fielding, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2007**, 51, 219.

<sup>6</sup> S. Pérez, K. Mazeau, C. Hervé du Penhoat, *Plant Physiology and Biochemistry* **2000**, 38, 37.

experimentales y cálculos de dinámica molecular en disolvente explícito. Como alternativa se puede emplear dinámica molecular con restricciones experimentales promediadas en el tiempo. En general a lo largo de esta tesis se ha empleado como primera opción los cálculos sin restricciones seguidos de la comparación con los datos experimentales de RMN, constantes de acoplamiento y distancias interprotónicas derivadas de medidas de NOE. Sólo en los casos en los que hubo discrepancias se realizaron cálculos restringidos empleando distancias experimentales.

## 2.2.1 Obtención de las estructuras tridimensionales del ligando libre de forma experimental.

### 2.2.1.1 Experimentos $^1\text{H}$ monodimensionales o $S^3$ -HMBC.

Para carbohidratos el análisis de las constantes de acoplamiento a tres enlaces proporciona una información de alta calidad y precisión sobre las geometrías torsionales y como consecuencia de la conformación de los anillos de piranosa. Las constantes de acoplamiento se pueden calcular teóricamente empleando varias ecuaciones; desde la ecuación de Karplus, hasta otras más sofisticadas y precisas como la de Altona que considera la electronegatividad de los sustituyentes. En la presente memoria se han empleado ecuaciones de Altona parametrizadas para cada enlace, en general usando el promedio a lo largo de la dinámica molecular calculado para cada estructura. Las medidas de estas constantes se han realizado habitualmente a partir de la separación de las señales en un  $^1\text{H}$  monodimensional normal o selectivo o mediante un  $S^3$ -HMBC.<sup>7</sup>

Este último experimento está basado en un experimento HMBC en el que se relacionan dos espines  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mediante un acoplamiento a largo alcance heteronuclear directo y otro espín  $^1\text{H}$  (pasivo) es atraído al espín  $^{13}\text{C}$  siendo sometido a una selección  $S^3$  mediante el acoplamiento heteronuclear a un enlace. Así el espectro de  $^1\text{H}$  activo es dividido en dos espectros.

---

<sup>7</sup> L. Kjaerulff, A. J. Benie, C. Hoeck, C. H. Gotfredsen, O. W. Sorensen, *Journal of Magnetic Resonance* **2016**, 263, 101.

Un experimento homonuclear en el que se miden las constantes de acoplamiento a partir de 3 espines (2 activos y 1 pasivo acoplado a los otros dos) es el E.COSY<sup>8</sup> obteniendo constantes de acoplamiento de multipletes multidimensionales de forma simplificada.

S<sup>3</sup>-HMBC es como una versión simple de dos experimentos tipo HMBC<sup>9,10</sup> en el que se produce una modificación en el programa de pulsos de uno de ellos incorporando un pulso adicional (S3 piz(S)). Se generan dos espectros desde el mismo conjunto de datos cuya substracción o adición corresponden a los espectros de los estados de los espines  $\alpha$  y  $\beta$  para el protón pasivo (I).

### 2.2.1.2 Experimentos NOESY.

El Efecto Nuclear Overhauser se debe a la relajación cruzada de dos espines nucleares provocada por la perturbación de un espín en el otro. Se puede calcular las distancias interprotónicas de aquellos protones conectados mediante un acoplamiento dipolar, para lo que es necesario que estén suficientemente próximos.

El Efecto Nuclear Overhauser se define como el cambio en la intensidad de la señal de RMN de un núcleo al perturbar otro núcleo próximo (ecuación 1). El efecto se debe a la asimetría generada en el sistema por la irradiación, ya que el núcleo perturbado no es capaz de recuperar el estado de equilibrio sin involucrar las poblaciones del otro núcleo.

$$\eta I\{S\} = \frac{I - I_0}{I_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

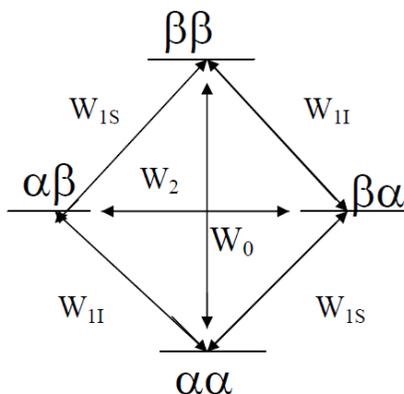
Para comprender mejor el fundamento del NOE se va a explicar suponiendo un sistema ideal formado por dos espines homonucleares de <sup>1</sup>H (constante giromagnética positiva) presentes en una molécula rígida y con movimiento isotrópico. Cuando el espín I es saturado el sistema pierde el equilibrio el cual es recuperado mediante diferentes mecanismos de relajación que afectan a las poblaciones de S. En el diagrama de la **figura 2.2.1.1** se observan las seis probabilidades de transiciones para un sistema de dos espines ( $W_0$ ,  $W_1$  y  $W_2$ ) pero sólo  $W_0$  y  $W_2$  son las responsables de la relajación cruzada por la cual se produce el NOE.

---

<sup>8</sup> A. Meissner, O. W. Sorensen, *Magnetic Resonance in Chemistry* **2011**, 39, 49.

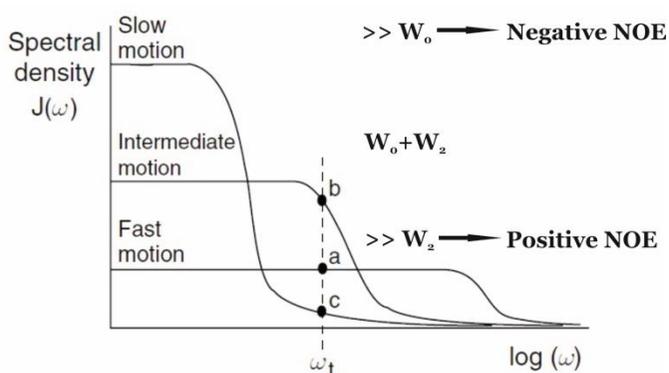
<sup>9</sup> W. F. Reynolds, R. G. Enríquez, *Journal of Natural Products* **2002**, 65, 221.

<sup>10</sup> A. Bax, M. F. Summers, *Journal of American Chemical Society* **1986**, 108, 2093.



**Figura 2.2.1.1** Diagrama de transiciones para un sistema de dos espines.

La **figura 2.2.1.2** representa la evolución de la función de densidad espectral ( $J(\omega)$ ) que describe el movimiento rápido, lento e intermedio de las especies en equilibrio en función del tiempo de correlación. Se muestra el signo del NOE en función de la transición que se produce mayoritariamente. Esta transición depende del tiempo de correlación molecular y, por tanto, del tamaño molecular. Así una molécula pequeña con un tiempo de correlación pequeño presenta mayoritariamente la transición  $W_2$  y el signo del NOE es positivo. Por el contrario, una molécula grande presenta un tiempo de correlación grande y un movimiento lento con la relajación más rápida predominando sólo el proceso de más baja energía  $W_0$ . Así la  $I > I_0$  y el NOE es negativo.



**Figura 2.2.1.2** Evolución de la función de densidad espectral en función del tiempo de correlación ( $\omega$ ).

Por lo tanto, el NOE resulta de un balance entre el signo de la relajación cruzada que viene dado por  $W_2 - W_0$  y el valor de las tres transiciones diferentes (ecuación 2).

$$\eta_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[ \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_0 + W_0} \right] = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[ \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

➤ Valoración de las distancias empleando la velocidad de relajación cruzada.

Este experimento se lleva a cabo a diferentes tiempos de mezcla para obtener una curva de crecimiento del NOE ya que la distancia está relacionada con el acoplamiento dipolar. Si es conocido el valor de la magnitud alcanzada por el espín A después de la inversión del espín B ( $\eta_A\{B\}$ ) y la distancia entre ambos espines se puede conocer el valor de la distancia entre los espines que se están estudiando (IS) a partir de su valor de  $\eta_I\{S\}$  (ecuación 3).

$$\frac{\eta_I\{S\}}{\eta_A\{B\}} = \frac{r_{IS}^{-6}}{r_{AB}^{-6}} \quad \text{Ecuación 3}$$

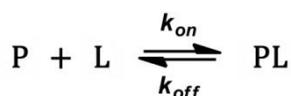
Para el cálculo de estas distancias se debe de asumir la aproximación de estado inicial por la que los dos espines que llevan a cabo una relajación cruzada se consideran como dos espines independientes de tal manera que el valor del NOE dependa linealmente del tiempo de mezcla (ISPA, *del inglés Isolated Spin Pair Approximation*). Para tiempos de mezcla largos el valor del NOE se aleja de la linealidad debido a que predomina la relajación del espín no perturbado frente a la relajación cruzada y el valor del NOE puede decaer a 0. El valor de la magnitud alcanzada por el espín I después de la inversión del espín S ( $\eta_I\{S\}$ ) y después de un tiempo  $\tau_m$  será proporcional al valor de la relajación cruzada que depende de  $r_{IS}^{-6}$  (ecuación 4).

$$\eta_I\{S\} = k\sigma_{IS}\tau_m = k'r_{IS}^{-6}\tau_m \quad \text{Ecuación 4}$$

Siendo k y k' constantes de proporcionalidad que contienen el  $\tau_c$  y constantes físicas conocidas.

## 2.2.2 Experimentos para la obtención de las estructuras tridimensionales del ligando asociado de forma experimental.

La espectroscopia de RMN es una técnica apropiada para obtener información estructural a nivel atómico de las interacciones proteína-ligando caracterizadas por cinéticas de asociación-disociación relativamente rápidas ( $K_{off} > 10^3$  Hz).<sup>11</sup> Además se puede aplicar a complejos proteína-ligando con afinidades (constantes de disociación) del orden de hasta milimolar lo que no es tan accesible para otras técnicas.<sup>5</sup> Cualquier proceso de formación de un complejo se basa en un proceso dinámico en el que participan diferentes especies en equilibrio, así las proporciones de las especies libre y enlazada dependerán de las condiciones experimentales.



Este proceso está caracterizado por una constante de disociación la cual indica la mayor o menor afinidad entre la proteína y el ligando. Además, se debe de tener en cuenta la cinética del proceso ya que para un sistema con un intercambio lento en la escala de desplazamientos químicos ( $K_{off}$  mucho menor que la diferencia de desplazamientos químicos entre los estados libre y enlazado, en Hz), el espectro presentará señales diferentes para cada uno de las especies. Sin embargo, para un sistema de intercambio rápido ( $K_{off}$  mucho mayor que la diferencia de desplazamientos químicos entre los estados libre y enlazado, en Hz) la señal de RMN observada es el promedio ponderado de las señales de los estados libres y enlazados, dependiente, por tanto de las fracciones de ligando en cada uno de los dos estados.<sup>12</sup> Así la ecuación 5 representa la magnitud (intensidad) de señal de RMN de medida en función de los dos estados mencionados.

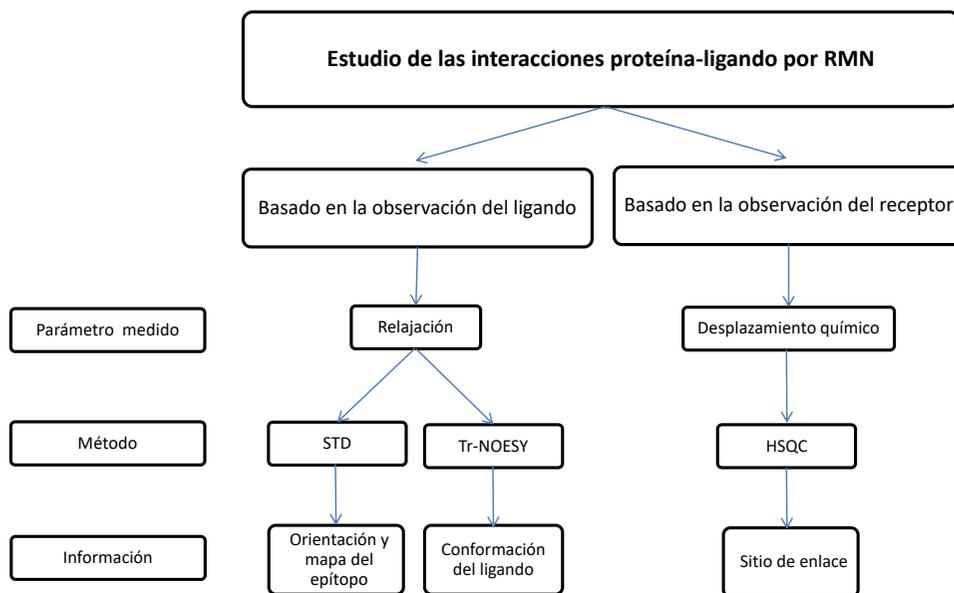
$$M_{obs} = X_{libre} \cdot M_{libre} + X_{enlazado} \cdot M_{enlazado} \quad \text{Ecuación 5}$$

El estudio de la interacción proteína-ligando utilizando RMN se basa en la observación de una de las dos especies que participan en el equilibrio, ligando o receptor (**figura 2.2.1**) y dependiendo de tal observación de realizarán experimentos observando el

<sup>11</sup> C. A. Lepre, J. M. Moore, J. W. Peng, *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 3641.

<sup>12</sup> T. Carlomagno, *Annual Review Biophysics Biomolecular Structure* **2005**, *34*, 245.

ligando (equilibrio rápido) u observando proteína (equilibrio lento en un complejo estable).



**Figura 2.2.2.1** Esquema representativo de los diferentes experimentos junto con los parámetros medidos e información obtenida.<sup>13</sup>

Mediante todas las técnicas de RMN se puede obtener información sobre la interacción proteína-ligando bien analizando los observables convencionales de RMN como desplazamientos químicos, anchura de línea y relajación de T1 selectivo o T2 o los observables debidos a la transferencia de magnetización de una especie a otra.<sup>13</sup> De esta manera los experimentos realizados para medir la interacción proteína ligando en esta tesis doctoral se basan en efectos de relajación (tr-NOESY y T1 selectivo) y de transferencia de magnetización (STD y WaterLOGSY).

### 2.2.2.1 Efecto Overhauser Nuclear (tr-NOESY).

El experimento tr-NOESY (NOESY tranferido)<sup>14,15,16,17,18,19</sup> se basa en el fundamento del NOE. Así, un ligando pequeño en su estado enlazado adquiere las características de

<sup>13</sup> S. Buda, M. Nawój, J. Mlynarski, *Annual Reports on NMR Spectroscopy* **2016**, 89, 185.

movimiento del receptor (variaciones de poblaciones) que son llevadas al seno de la disolución donde son medidas en el ligando en su forma libre. Debido a que la relajación del receptor es muy eficaz (NOE negativo e intenso) cuando el ligando sale del complejo presenta cambios en las poblaciones tan grande que supera los cambios en las poblaciones del ligando libre (NOE positivo y poco intenso).

La ecuación que se debe de cumplir para tener seguridad que se están midiendo las características del complejo es la ecuación 6.

$$f_{\text{enlazado}} * \sigma_{\text{enlazado}} \gg f_{\text{libre}} * \sigma_{\text{libre}} \quad \text{Ecuación 6}$$

### 2.2.2.2 Diferencia de saturación transferida (STD). *¡Error! Marcador no definido.*

Esta técnica se basa en la transferencia de magnetización de una especie (proteína) a la otra (ligando) que forman parte del complejo formado. Para que ocurra este efecto se satura selectiva y específicamente una parte de la proteína (protones de los anillos aromáticos, grupos alifáticos...) a partir de la cual la magnetización se difunde a través de ella (difusión de espín) y después la magnetización pasa a los protones del ligando cercanos a la proteína a través de NOEs intramoleculares cuando se encuentra en el tiempo de residencia en el estado enlazado. Cuando el ligando libre se disocia del complejo mantiene la información obtenida del complejo en forma de polarización de espín que mantiene durante un tiempo hasta que recobra sus propiedades de ligando libre (**figura 2.2.2.2**).<sup>20</sup>

<sup>14</sup> P. Balaram, A. A. Bothner-By, E. Breslow, *Journal of de American Chemical Society* **1972**, *94*, 4017.

<sup>15</sup> P. Balaram, A. A. Bothner-By, E. Breslow, *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94*, 4015.

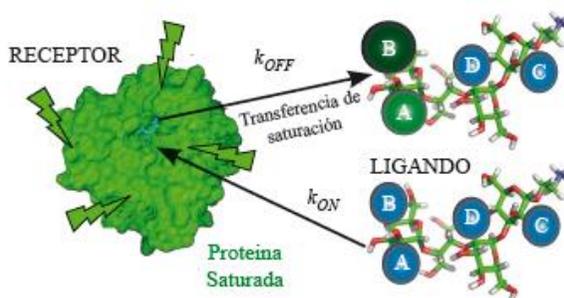
<sup>16</sup> G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Journal of Magnetic Resonance* **1983**, *53*, 423.

<sup>17</sup> H. N. B. Moseley, E. V. Curto, N. R. Krishna, *Journal of Magnetic Resonance Series B* **1995**, *108*, 243.

<sup>18</sup> F. Ni, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1994**, *26*, 517.

<sup>19</sup> C. B. Post, *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, *13*, 581.

<sup>20</sup> J. Angulo, P. M. Nieto, *European Biophysics Journal* **2011**, *40*, 1357.

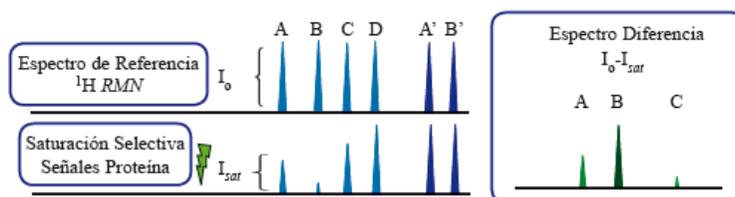


**Figura 2.2.2.2** Representación del proceso del experimento STD durante el cual se irradia el receptor.

Debido a que esta técnica se suele usar para equilibrios donde las constantes de disociación pueden variar de 10 nM a 10 mM se debe de tener muy en cuenta las condiciones experimentales para la realización de estos experimentos. Así para equilibrios con baja afinidad puede ocurrir que obviamente no se forma complejo y para equilibrios con bastante afinidad puede ocurrir que el ligando no se disocie. Al igual que para el NOE es muy importante la cinética del equilibrio. Durante un intercambio rápido el ligando se disociará del complejo portando la información deseada que pasará al seno de la disolución. Y si el ligando está en exceso saturará el sitio de reconocimiento de la proteína aumentando la proporción de ligando saturado en el seno de la disolución durante el tiempo de saturación antes de que pierda la información de ligando enlazado por su relajación longitudinal y trasversal ( $s^{-1}$ ). Si el intercambio es lento, el ligando no se separará del complejo y relajará en el sitio de reconocimiento antes de disociarse o incluso no se disociará por lo que la magnetización en el seno de la disolución es nula. Además de la cinética y de la afinidad de la interacción proteína-ligando también es bastante influyente el exceso de ligando empleado y el tiempo de saturación. De forma general se define que el ligando debe de presentarse en una proporción de 50 a veces 1000 veces mayor que la proteína. Cuanto mayor sea el tiempo de saturación y el cantidad de ligando enlazado mayor será los valores de STD. Después de todo esto se puede “asegurar” que no se deben comparar valores de STD para diferentes equilibrios y especies ya que hay una gran cantidad de condiciones para la obtención de estos valores.

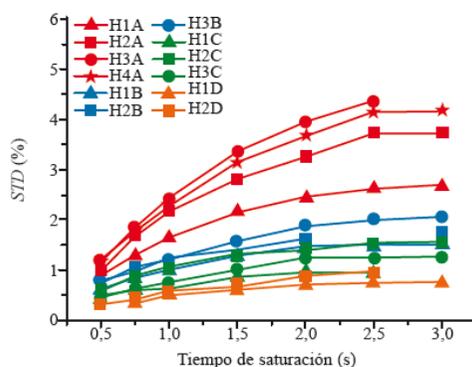
Este experimento se lleva a cabo a dos frecuencias diferentes. Por un lado, se irradia a una frecuencia de 7 ppm (aromáticos) o a 0-1 ppm (grupos alifáticos) saturando ciertos protones de la proteína. El espectro obtenido es on-resonance y se puede medir un valor de intensidad de  $I_{sat}$ . Por otro lado, se irradia a una frecuencia que se encuentre lejos de los valores de la proteína y del ligando obteniendo un espectro de referencia denominado off-resonance. De este espectro se obtiene un valor de intensidad de  $I_0$ . De

la diferencia de ambos espectros ( $I_{\text{sat}} - I_0$ ) se obtiene el espectro STD (de diferencia) el cual proporciona información acerca de la parte del ligando que se encuentra más próximo a la proteína y, por supuesto, de la interacción proteína-ligando. Así podemos obtener un valor de saturación STD para cada uno de los protones que intervengan en el enlace (**figura 2.2.2.3**).



**Figura 2.2.2.3** Espectro de referencia, de saturación (a la izquierda) y de diferencia (STD) a la derecha.

La aplicación de este experimento es para conocer el mapa del epítipo y la orientación del ligando al interactuar con la proteína. Para ello, se calcula el valor de  $\text{STD}_0$  a partir de los valores de STD medidos en el espectro. Se construye una gráfica la cual representa la curva de crecimiento de los valores de STD medidos a diferentes tiempos de saturación para cada protón (**figura 2.2.2.4**). De esta gráfica se obtiene el valor de  $\text{STD}_0$  (valor de la pendiente inicial de crecimiento) mediante un ajuste matemático a una ecuación mono-exponencial.<sup>21</sup>



<sup>21</sup> M. Mayer, T. L. James, *Journal of the American Chemistry Society* **2004**, 126, 4453.

**Figura 2.2.2.4** Curvas de crecimiento obtenidas para la interacción de 2G12 (un anticuerpo del VIH) con un tetramanósido mimético de *high-mannose*. Fuente: Enríquez-Navas et al. 2011.<sup>22</sup>

### 2.2.2.3 $T_1$ selectivo (relajación longitudinal).<sup>5,23</sup>

En un sistema de dos espines nucleares la relajación puede ocurrir mediante dos mecanismos:  $T_1$  (longitudinal) y  $T_2$  (trasversal).<sup>24</sup> Además, la relajación  $T_1$  puede ser selectiva o no, aunque se conoce que el índice de relajación longitudinal selectiva ( $1/T_1(\text{sel})$ ) de los ligandos es un indicador de interacción más sensible que el índice no selectivo.<sup>25</sup>

Debido a la gran diversidad de la espectroscopía de resonancia se conocen varios métodos para medir la constante de acoplamiento para un sistema proteína-ligando dado<sup>26</sup>. Uno de esos métodos puede ser el  $T_1$  selectivo aplicado en uno de los sistemas estudiados en esta tesis (interacción del FGF-1 con trisacáridos de heparina) se ha utilizado este método para la determinación de la constante de disociación. Los tiempos de relajación fueron medidos por una secuencia de pulsos con inversión recovery (un pulso de  $180^\circ$  con forma y un pulso de  $90^\circ$  duro).

En un sistema de interacción proteína-ligando donde el ligando se encuentra en exceso sobre el receptor el valor de la relajación del ligando viene descrita por la ecuación 2.

$$1/T_{1\text{obs}} = 1/T_{1\text{free}} + f_{\text{bound}} (T_{1\text{bound}} + \sigma_{\text{bound}}) \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde  $f_{\text{bound}}$  es la fracción del ligando enlazado ( $[PL]/[P]$ ) y  $\sigma_{\text{bound}}$  es el tiempo de vida del estado enlazado. La relación entre la concentración de ligando total y  $T_1$  es representada en la ecuación 8. Así, se puede obtener valores de constante de disociación para un sistema en equilibrio.

<sup>22</sup> P. M. Enríquez-Navas, M. Marradi, D. Padro, J. Angulo, S. Penadés, *Chemistry- A European Journal* **2011**, 17, 1547.

<sup>23</sup> Y. Fraenkel, G. Navon, A. Aronheim, J.M. Gershoni, *Biochemistry*, **1990**, 29, 2617.

<sup>24</sup> M. C. Fernandez-Alonso, M. A. Berbis, A. Canales, A. Ardá, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *New Applications of High-Resolution NMR in Drug Discovery and Development* **2013**, 1, 7.

<sup>25</sup> G. Valensin, T. Kushnir, G. Navon, *Journal of Magnetic Resonance* **2004**, 46, 23.

<sup>26</sup> L. Fielding, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2003**, 3, 39.

$$[P_0]*T_{1obs} = ([L_0] + K_D) (T_{1enlazado} + \sigma_{enlazado}) \quad \text{Ecuación 8}$$

Varios ejemplos utilizando este tipo de experimentos son representados en la bibliografía.

Debido a que se produce una interacción dipolo-dipolo la cual provoca una relajación T, esta magnitud se puede expresar en términos de  $\sigma_{ij}$  y  $\rho_{ij}$ , relajación cruzada y autorelajación respectivamente<sup>21</sup> que dependen a su vez del tiempo de correlación.

Un experimento complementario al STD es el WaterLOGSY ya que aunque proporciona información sobre el modo de unión del complejo también ofrece información adicional sobre la capa de hidratación de la interfase proteína-ligando.<sup>27</sup> Así, la magnetización es transferida desde el agua del seno de la disolución presente en la interfaz ligando-proteína, la cual trasfiere magnetización a los protones del ligando a través de dos procesos.<sup>28,29,30</sup>

## 2.3 MÉTODOS TEÓRICOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL LIGANDO LIBRE Y DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-LIGANDO.

### 2.3.1 Cálculos computacionales (dinámica molecular) para el estudio teórico de la geometría tridimensional del ligando.

Una de las propuestas en este grupo de investigación hace un tiempo fue la aplicación de dinámicas moleculares con disolvente explícito para ligandos derivados de Heparina (trisacáridos) obteniendo estructuras en movimiento de los compuestos y sus propiedades en disolución asemejando el sistema a la forma de estudio experimental.

---

<sup>27</sup> L. Geist, M. Mayer, X. L. Cockcroft, B. Wolkerstorfer, D. Kessler, H. Engelhardt, D. B. McConnell, R. Konrat, *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, DOI 10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B00845

<sup>28</sup> C. Dalvit, G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, B. Stockman, *Journal of Biomolecular NMR* **2001**, *21*, 349.

<sup>29</sup> C. A. Lepre, J. M. Moore, J. W. Peng, *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 3641.

<sup>30</sup> J. W. Peng, J. Moore, N. Abdul-Mana, *Progress in Nuclear Magnetic Spectroscopy* **2004**, *44*, 225.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hubo la necesidad de aplicar el sistema utilizado en el grupo a ligandos nuevos derivados de CS e híbridos DS/CS con grupos aromáticos como sustituyente. El problema encontrado fue la poca bibliografía existente para este tema lo que provocó proponer un protocolo para la realización de estas simulaciones. Este protocolo está dividido en la preparación de los archivos de los residuos nuevos necesarios para la realización de la simulación y la propia simulación en sí.

1. Preparación de los residuos por separado partiendo de una estructura con formato pdb. Para ello se utilizó Glycam-06 ya que es bien conocido el uso de este campo de fuerza a la modelización de carbohidratos, glicoproteínas y glicolípicos incluso para complejos proteína ligando<sup>31,32</sup> describiendo las propiedades fisicoquímicas de los glicanos y glicoconjugados siendo totalmente compatible con el campo de fuerza AMBER. Además se ha usado como parámetros PARM 94<sup>33</sup> ya que es el usado por AMBER para el empleo de las componentes van der Waals en la modelización de carbohidratos. Para la obtención de las cargas de cada uno de los residuos se usó el método RESP y el módulo de antechamber y parmchk el cual nos permite la obtención de las propiedades de los residuos. Y por último se usó el módulo de tleap de AMBER<sup>34</sup> para la creación de los archivos que contienen las coordenadas y propiedades de nuestro sistema. En el cual se hace mención a la solvatación del sistema y a la inclusión del disolvente explícito como moléculas de agua TIP3P.
2. Una simulación de dinámica molecular consiste en la aplicación de leyes de movimiento a los átomos que forman parte de las moléculas como un conjunto de configuraciones moleculares. Para eso se calcula las coordenadas de desplazamiento (trayectoria) de un sistema molecular a una temperatura dada encontrando

---

<sup>31</sup> K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel, J. Gonzalez-Outeirino, C. R.

Daniels, B.L. Foley, R. J. Woods, *Journal of Computational Chemistry* **2008**, 29, 622.

<sup>32</sup> M. B. Tessier, M. L. Demarco, A. B. Yongye, R. J. Woods, *Molecular Simulation* **2008**, 34, 349.

<sup>33</sup> W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 5179.

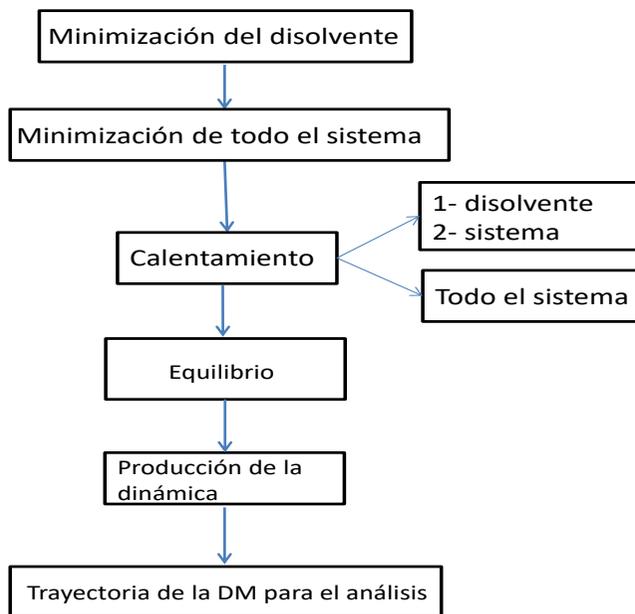
<sup>34</sup> T. A. D. D. A Case, T. E. Cheatham, III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R., R. C. W. Luo, W. Zhang, X. Wu, S. R. Brozell, H. G. T. Steinbrecher, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M. J. Hesieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H., M. G. S. Mathews, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P. A. Kollman, *University of California, San Francisco* **2010**.

velocidades y posiciones de un conjunto de partículas como una función del tiempo llevado a cabo por ecuación de movimiento en tiempo de Newton's. Estas simulaciones son llevadas a cabo mediante un conjunto microcanónico (NVE) o canónico (NVT) determinando las propiedades termodinámicas.

El procedimiento descrito en la **figura 2.3.1.1** representa todos los pasos seguidos en equilibrar el sistema antes de la producción de la dinámica y la obtención de la trayectoria. Para la simulación de la dinámica se utilizan varios algoritmos y las propiedades observadas físicamente son computadas a un tiempo promedio en conjunto de microestados individuales. Por eso las dinámicas deben de ser suficientemente largas como para que los movimientos importantes sean bien mostrados estocásticamente. Sin embargo, se debe de tener en cuenta la longitud de dichas dinámicas ya que se puede producir desviaciones del campo de fuerza.<sup>35</sup> Otra limitación de las dinámicas es que las moléculas de estudio se sometan a eventos dinámicos lo que provoque un aumento en la escala de tiempo de la simulación. Este puede ser solventado mediante el aumento de la temperatura para alcanzar la conformación más estable energéticamente lo que puede provocar conformaciones no reales.

---

<sup>35</sup> K. N. Kirschner, R. J. Woods, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **2001**, 98, 10541.



**Figura 2.3.1.1** Protocolo de seguimiento para la obtención de las trayectorias de las Dinámicas Moleculares.

### 2.3.2.1 *Simulaciones de dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo.*

Estas simulaciones fueron desarrolladas para generar estructuras consistentes con los datos experimentales obtenidos de RMN. Para ello se lleva a cabo la simulación con restricciones promediadas en el tiempo. Estas restricciones suelen ser distancias experimentales procedentes de los NOEs interprotónicos. Para conducir las estructuras hacia valores experimentales se debe de incluir un término de energía artificial  $E_{\text{penalti}}$  basada en una incorporación de una función penalti que se suma a la energía del sistema  $E_{\text{sistema}}$  para obtener la energía total del sistema  $E_{\text{total}}$ . La función penalti es una función artificial que presenta tres regiones diferentes. Para definir esta función se necesita un margen del 10% del valor de la distancia experimental determinando los valores de  $r_1$ ,  $r_2$ ,  $r_3$  y  $r_4$  pasando desde una  $E_{\text{penalti}}$  de 0 a una función parabólica y a una lineal.

Las estructuras generadas con esta metodología pueden mostrar las características procedente de un sistema en equilibrio conformacional<sup>36,37,38</sup> como el equilibrio del IdoA ampliamente estudiado.<sup>39</sup> La distancia R en este tipo de simulaciones es una distancia promedio dependiente del tiempo.

### 2.3.2 Cálculos teóricos para el estudio teórico de la geometría tridimensional del complejo.

Al igual que existen gran cantidad de experimentos de RMN que se pueden llevar a cabo para el estudio de las interacciones proteína-ligando también se desarrollaron métodos computacionales para el mismo estudio. Durante la realización de esta tesis doctoral sólo se han utilizado dos métodos teóricos para el estudio de los complejos, docking y CORCEMA-ST, cuyos fundamentos serán mostrados a continuación.

#### 2.3.2.1 Docking.

El docking es un procedimiento computacional que predice la orientación y conformación de uno o más ligandos enlazados a una proteína. Hay diversos programas utilizados para la realización de un docking<sup>40,41</sup> que aunque trabajan de forma ligeramente diferente todos presentan características comunes como la búsqueda de localizaciones en la superficie de la proteína que permiten las interacciones favorables con el ligando, la búsqueda conformacional del ligando y el cómputo de la energía de interacción entre la proteína y el ligando (resultado de la afinidad de enlace o la función “scoring”).

Uno de los programas utilizados para la realización de un docking es *glide* (del inglés, *grid-based ligand docking with energetic*) que usa una serie de filtros jerárquicos que evalúa la interacción del ligando en el sitio activo del receptor.

---

<sup>36</sup> R. K. a. E. R. P. Z. W. F. van Gunsteren, “Proceedings NATO/CECAM workshop on nucleica cid conformation and dynamics” W. K. Olson ed **1984**, 79-92.

<sup>37</sup> D. A. Cumming, J. P. Carver, *Biochemistry* **1987**, 26, 6664.

<sup>38</sup> P. M. S. Hendrickx, F. Corzana, S. Depraetere, D. A. Tourwé, K. Augustyns, J. C. Martins, *Journal of Computational Chemistry* **2010**, 31, 561.

<sup>39</sup> Z. Zhang, S. A. McCallum, J. Xie, L. Nieto, F. Corzana, J. Jiménez-Barbero, M. Chen, J. Liu, R. J. Linhardt, *Journal of the American Society* **2008**, 130, 12998.

<sup>40</sup> Autodock The Scripps Research.

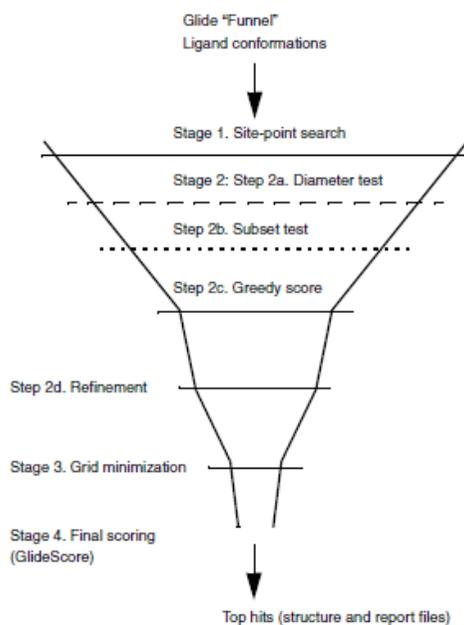
<sup>41</sup> Glide manual.

La búsqueda de la localización y orientación se lleva a cabo mediante un procedimiento (**figura 2.3.2.1**) por Glide. El procedimiento consiste en diferentes etapas:

1. Búsqueda del “Site point” en un espacio de 2 Å cubriendo la región del sitio activo. Para ello se mide la distancia desde el “site point” a la superficie del receptor y desde del centro del ligando hasta la superficie del ligando (átomo en el extremo) las cuales son comparadas y si son presentan una coincidencia suficientemente buena se coloca el dentro del ligando en el “site point”.
2. En la segunda etapa se analiza el ligando en diferentes subetapas.
  - 2a. Test del diámetro del ligando analizando la ubicación de los diferentes átomos. Se produce una selección de las posibles orientaciones del diámetro pero si se producen demasiados impedimentos estéricos con el receptor, la orientación se omite.
  - 2b. Se considera la rotación alrededor del diámetro del ligando puntuando las interacciones entre los átomos capaces de formar puentes de hidrógenos o interacciones de los metales con el receptor. Si este resultado es aceptable se puntúan todas las interacciones ligando y receptor.
  - 2c. Se lleva a cabo una pequeña puntuación de la molécula dependiendo de la posición relativa de los átomos al receptor. Para ello se utiliza un algoritmo de la función de puntuación empírica ChemScore de Schrodinger que reconoce las interacciones hidrofóbicas, los enlaces de hidrógeno y las interacciones con los metales penalizando los impedimentos estéricos.
  - 2d. Por último se lleva a cabo un refinamiento de las estructuras obtenidas por el cual se permite la rotación del ligando en un radio de 1 Å en todas las direcciones cartesianas y se vuelve a puntuar las estructuras mejor puntuadas de la etapa anterior. Al siguiente filtro sólo pasan aproximadamente unas 400 estructuras.
3. Minimización de energía. Se comienza por unos filtros (grid) de van der Waals y electrostáticos suaves que van aumentando su potencia. Así se reduce los grandes términos de energía y los gradientes producidos por contactos interatómicos próximos permitiendo un movimiento más libre. Se optimizan los ángulos de torsión en un docking flexible y por último se usa Monte Carlo para explorar la torsión mínima para un número pequeño de estructuras de menor energía.

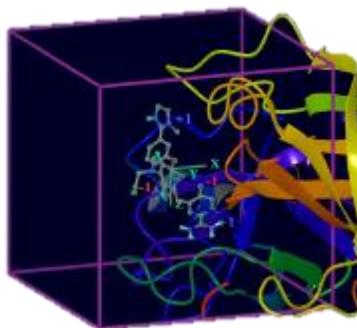
4. En la última etapa las estructuras cuya energía han sido minimizada se calcula una puntuación mediante una función scoring, GlideScore, basada en ChemScore.

A partir de GlideScore se calcula el término Docking Score en el que se tiene en cuenta la penalización del estado Epik y las deformaciones (si se usasen). Por último, la selección de la mejor estructura obtenida se lleva a cabo mediante Emodel que combina la afinidad del enlace predicha por GlideScore, la energía de tensión interna y la energía Coulomb-vdW.



**Figura 2.3.2.1** Esquema jerárquico usado por Glide para llevar a cabo el docking.

Antes de comenzar cualquier cálculo de docking se debe de generar un grid. Este grid generado representa la forma y las propiedades del receptor, por lo que Glide permite definir la estructura del receptor mediante un grid de 30 Å máximo (**figura 2.3.2. 2**). Además, el ligando (su centro) también es definido en la generación del grid. Así, se construye un grid más pequeño para el punto medio del diámetro del ligando. Las dimensiones de este grid varían en un rango de 6 a 14 Å permitiendo la búsqueda de un modo de enlace asimétrico o inusual en el sitio activo.



**Figura 2.3.2.2** Representación del Grid utilizado para la realización del docking. Fuente: Schrödinger Suite 2012.

➤ Docking de precisión extra (XP).

Este docking es una poderosa herramienta diseñada para distinguir estructuras con alta energía de *scoring* que podrían ser falsos positivos a partir de métodos bien conocidos de la química física.

El modo de precisión extra es una herramienta de refinamiento diseñada para usar solo en buenas poses de ligando. El método más extenso de acoplamiento de XP y el método de puntuación XP especializado están fuertemente acoplados: las estructuras más precisas producidas por el acoplamiento XP son necesarias para el método de puntuación XP más exigente. Debido a que el modo de acoplamiento de XP requiere mucho más tiempo de CPU, primero debe seleccionar grandes conjuntos de ligandos en modo de precisión estándar (SP) o en modo de detección virtual de alto rendimiento (HTVS). Solo los ligandos de mayor puntuación deberían de ser usados con el docking de modo XP.

En cualquier método de acoplamiento basado en grid, el receptor está esencialmente congelado. El modo XP es menos permisivo que el SP, por lo que puede descartar falsos positivos y está diseñado para localizar compuestos activos que se unen a una conformación particular del receptor. Se puede evitar que los compuestos activos se acoplen si estos compuestos no son compatibles con la conformación particular del receptor que se está utilizando.

El método de muestreo XP se basa en una estrategia de anclaje y crecimiento refinado. Los fragmentos de anclaje del ligando acoplado, típicamente anillos, se eligen del conjunto de las poses de SP y la molécula se vuelve a crecer unida por enlace a partir de

estas posiciones de anclaje. Las minimizaciones completas y el puntaje XP se llevan a cabo en el gran conjunto de poses generado por este método de crecimiento. En varios ciclos, el crecimiento se centra en intentar aliviar las penalizaciones de puntuación de XP y optimizar las mejores poses de puntuación. Este muestreo focalizado es esencial para permitir el uso de la función de puntuación de XP dura, así como para encontrar las mejores cuencas de puntuación de atracción. Es importante tener en cuenta que el acoplamiento entre el muestreo extra y el puntaje de XP significa que no se recomienda puntuar simplemente las poses de SP con puntuación de XP.

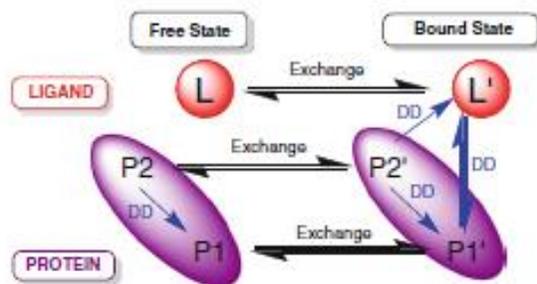
GlideScore XP recompensa específicamente la ocupación de las interacciones hidrofóbicas bien definidas por grupos de ligandos hidrofóbicos. Los términos de recompensa hidrofóbica se emplean en funciones de puntuación empírica como ChemScore y la versión SP de GlideScore en forma de términos de pares lipófilo-lipófilo. Las investigaciones han demostrado que los términos de pares simples subestiman los efectos hidrofóbicos en ciertos casos bien definidos. El término hidrofóbico en GlideScore XP se desarrolló para compensar esta subestimación. El término puede conferir hasta varios kcal/mol de energía de unión adicional en casos favorables. Mejora considerablemente los factores de enriquecimiento de GlideScore XP incluyendo mejoras en la puntuación de enlaces de hidrógeno, la detección de grupos polares enterrados y la detección de  $\pi$ -catión e interacciones de acoplamiento  $\pi$ - $\pi$ .

#### 2.3.2.2 CORCEMA-ST.

Esta metodología fue desarrollada para el análisis cuantitativo de los valores de STD en la formación de un complejo ligando-receptor.<sup>42</sup> Se basa en una modificación de la teoría de CORCEMA (*del inglés, Complete Relaxation and Conformational Exchange Matrix*) desarrollada por los experimentos de NOE transferido,<sup>17</sup> por lo que el fundamento de esta técnica se basa en los fenómenos de NOE transferido y de STD que ocurren mediante un equilibrio rápido (**figura 2.3.2.3**).

---

<sup>42</sup> V. Jayalakshmi, N. R. Krishna, *Journal of Magnetic Resonance* **2002**, 155, 106.



**Figura 2.3.2.3** Representación esquemática de dos estados para el desarrollo de la teoría de CORCEMA-ST a partir de las coordenadas cartesianas del complejo (estado unido) y del receptor y del ligando en su forma libre. Se satura los protones del receptor P2 que pasa la saturación mediante intercambio químico (flechas negras) o relajación cruzada dipolo-dipolo (NOE, flechas azules).

Mediante el programa MatLab<sup>43</sup> se puede aplicar el protocolo de CORCEMA para el análisis cuantitativo de los valores de STD o el refinamiento de la conformación de los ligandos enlazados dentro del sitio activo del receptor (SICO, STD Intensity-restrained CORCEMA Optimization). Así CORCEMA-ST (una variante de CORCEMA)<sup>20</sup> permite predecir las intensidades de STD conociendo las coordenadas atómicas Cartesianas del complejo ligando-receptor y las propiedades del sistema.

El protocolo de CORCEMA-ST es el siguiente:

1. Obtener las coordenadas PDB del ligando libre, proteína y complejo desde modelos ya existentes en Protein Data Bank o desde modelos propuestos modificados. Si la proteína está bien caracterizada por espectroscopía de RMN y la asignación de todos los átomos es completa es posible definir los protones que son saturados. Si no es el caso existe en la versión de CORCEMA-ST (v 3.8) un script para predecir los desplazamientos químicos de la proteína mediante ShiftX<sup>44</sup>. Estos desplazamientos químicos se obtienen de bases de datos y proporcionan una estructura 3D de la proteína.
2. Se deben de definir una serie de input para el sistema.

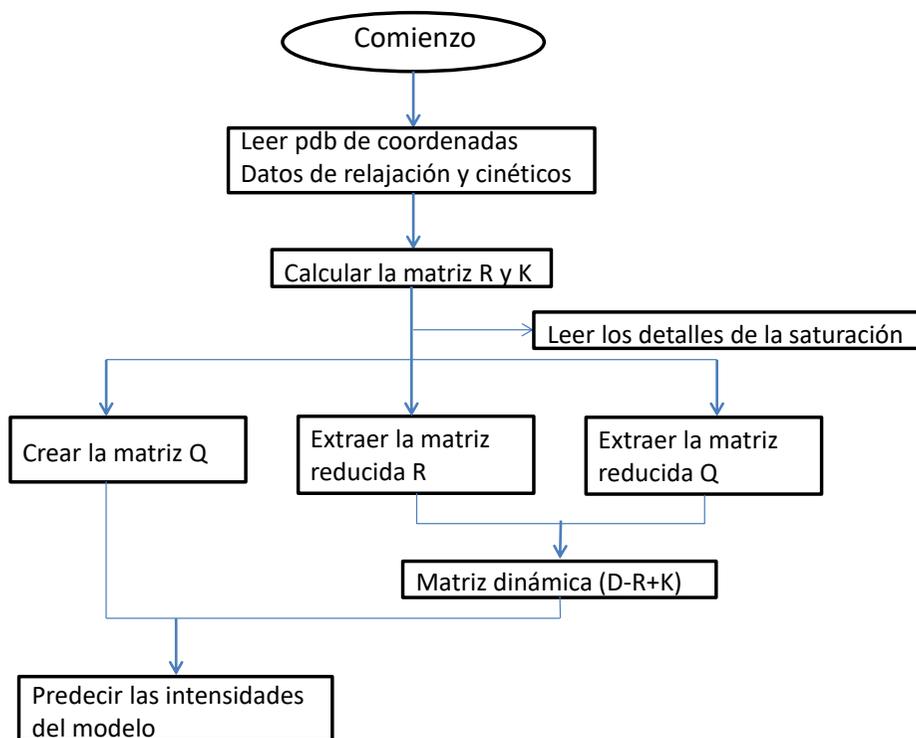
<sup>43</sup> MATLAB versión 7.11.0 (R2010b) ed.; The MathWorks Inc.: Natick, Massachusetts, 2010.

<sup>44</sup> S. Neal, A. M. Nip, H. Zhang, D. S. Wishart, *Journal of Biomolecular Nmr* **2003**, *26*, 215.

- a) El número de protones del ligando (N) y de la proteína (M) cerca del sitio de enlace.
- b) Datos cinéticos y de enlace como la constante de disociación  $K_D$  de los complejos y los valores de  $K_{on}$  y  $K_{off}$ .
- c) Un valor para  $\rho^*$  (autorelajación) de los protones individuales en el estado libre y enlazado.
- d) Tiempos de correlación de las moléculas en el estado libre y enlazado.
- e) Las concentraciones del ligando y la proteína en la muestra que serán usadas para calcular la existencia de las especies en disolución seguido de la ecuación estándar de enlace proteína-ligando. Las intensidades en el equilibrio ( $I_0$ ) son proporcionales a las concentraciones.
- f) Frecuencia a la cual se pretende irradiar los protones de la proteína (0 o 7 ppm) y la frecuencia de irradiación de referencia (40 ppm).
- g) Tiempos de saturación adecuados para obtener una curva de crecimiento de STD de forma asintótica.

A partir de estos datos el programa devuelve output los cuáles indican la intensidad de STD para cada valor de saturación lo que permite la construcción de una curva de crecimiento de dichos valores y obtener un valor de  $STD_0$  teórico que será comparado con el experimental.

El protocolo de CORCEMA-ST usado para el cálculo de las intensidades de STD y optimización de la conformación del ligando enlazado (SICO)<sup>42</sup> se muestra en la **figura 2.3.2.4**.



**Figura 2.3.2.4** Protocolo usado en CORCEMA-ST para obtener los valores de intensidades teóricas para ser comparados con los experimentales.

Después de obtener las intensidades teóricas se comparan con las experimentales calculando el valores del factor R-NOE. Si este factor no está por debajo de 0.5 se considera que el modelo del complejo propuesto no reproduce los datos de STD experimentales y, por lo tanto, no es aceptable. Debe de repetirse el protocolo de CORCEMA-ST modificando los ángulos de torsión y/o los parámetros hasta obtener un valor de R-NOE aceptable. Este valor es calculado mediante la ecuación 8.

$$R - NOE = \sqrt{\frac{\sum W_k (STD_{0,k}^{exp} - STD_{0,k}^{calc})^2}{\sum W_k (STD_{0,k}^{exp})^2}} \quad \text{Ecuación 8}$$

La ecuación usada por CORCEMA-ST para ofrecer un valor de intensidad de STD es la mostrada en la ecuación 9.

$$I(t) = I_0 + [1 - \exp(-(R+K)t)] (R+K)^{-1} Q$$

Ecuación 9

Donde  $t$  son los tiempos de saturación,  $I$  es la matriz intensidad,  $I_0$  es la matriz que corresponde al equilibrio térmico y  $R + K$  corresponden a la matriz dinámica donde  $R$  representa el valor de la relajación generalizada y  $K$  el valor cinético generalizado,  $Q$  es el elemento de la relajación cruzada.<sup>42</sup>

## **CAPÍTULO 3**

### **Interacción GAGs derivados de Heparina con FGF-1 y Langerina.**

### 3.1 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

En el primer capítulo se explicó brevemente la estructura del FGF-1 y la formación e importancia biológica del complejo terciario formado por FGF:FGFr:Hp. Como antecedentes en este capítulo se va a poner de manifiesto los estudios más relevantes realizados con el FGF-1. Se va a mostrar tanto su interacción con diferentes GAGs derivados de HS/Hp como datos de su actividad biológica. La primera parte de este capítulo nos ayudará a comprender con más detalle la estructura básica de GAGs que es reconocida por este factor de crecimiento y la activación de la actividad mitogénica del FGF-1 por GAGs.

Hoy en día se conoce claramente el sitio de reconocimiento del FGF-1 por GAGs como HS y/o Hp.<sup>1,2</sup> Este factor de crecimiento en su superficie presenta dos zonas de reconocimiento de GAGs, principal y secundaria (**figura 3.1.1**). Las dos zonas presentan una superficie electrostática positiva capaz de acomodar las cargas negativas de los grupos sulfato que se encuentran como sustituyentes en la Hp. Estas dos zonas se diferencian en la capacidad para acomodar más o menos cargas negativas procedentes del Hp-GAG. Así, la zona principal presenta la longitud necesaria para acomodar las cargas negativas de tres grupos sulfato mientras que la zona secundaria puede acodar sólo dos. Esta diferencia provoca que los GAGs se orienten en una u otra zona o incluso en las dos en función de su tamaño y su patrón de sustitución. Se conoce que el amplio rango de estas interacciones tan específicas depende de la secuencia, la distribución de carga y la flexibilidad conformacional del anillo de Idurónico que presenta la Hp.<sup>3,4,5,6</sup> Además, se ha demostrado la importancia del patrón de sulfatación de la Hp en el reconocimiento proteína-ligando.

---

<sup>1</sup> A. D. Digabriel, I. Lax, D. I. Chen, C. M. Svahn, M. Jaye, J. Schelessinger, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, 393, 812.

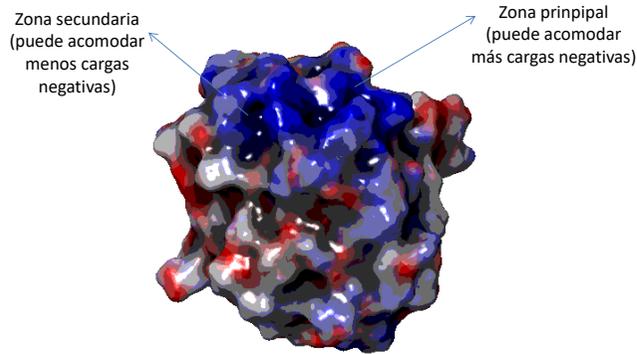
<sup>2</sup> A. Canales, R. Lozano, B. López-Méndez, J. Angulo, R. Ojeda, P. M. Nieto, M. Martín-Lomas, G. Giménez-Gallego, J. Jiménez-Barbero, *FEBS Journal* **2006**, 273, 4716.

<sup>3</sup> J. Turnbull, A. Powell, S. Guimond, *TRENDS in Cell, Biology* **2001**, 11, 75.

<sup>4</sup> B. Casu, M. Petitou, M. Provasoli, P. Sinay, *TIBS* **1988**, 13, 221.

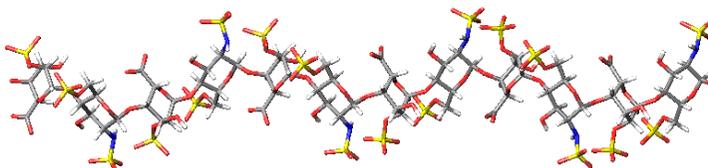
<sup>5</sup> N. Jastrebova, M. Vanwildemeersch, U. Lindhal, D. Spillmann, *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 26842.

<sup>6</sup> S. E. Guimond, J. E. Turnbull, *Current Biology* **1999**, 9, 1343.



**Figura 3.1.1** Estructura del FGF-1 (2ERM) representada con la superficie de potencial electrostático.

El HS-GAGs es un polisacárido lineal que contiene unidades D-GlcN y D-GlcA o L-IdoA. De la biosíntesis de este GAGs resulta residuos sulfatados y no sulfatados distribuidos en diferentes zonas de la cadena. La **figura 3.1.2** muestra la estructura de Hp natural, la cual presenta una estructura tridimensional helicoidal. De esta forma, en la estructura de la Hp se puede observar gran cantidad de grupos sulfato orientados hacia ambas caras de su eje longitudinal. Este patrón de sulfatación es muy importante para la dimerización del FGF-1 (complejo 2:2:2) ya que la Hp actúa como nexo de unión entre dos cadenas de FGF-1 y los FGFR.



**Figura 3.1.2** Estructura de la Hp (<sup>1</sup>HPN). Representación de los anillos de IdoA en su conformación <sup>1</sup>C<sub>4</sub>.

Un tema muy estudiado por diferentes investigadores durante muchos años ha sido la longitud mínima necesaria de GAGs que interactúan con el FGF-1 provocando su respuesta biológica. Este tema ha sido muy controvertido debido al patrón de sulfatación tan diferente que pueden presentar los GAGs tipo Hp y HS. Parece que la longitud mínima de la Hp para enlazar con FGF-1 es la estructura formada por cuatro monosacáridos que contiene un trisacárido totalmente sulfatado en el extremo reductor imprescindible para interactuar con el FGF-1. Esta secuencia trisacáridica está

formada GlnN6SO<sub>3</sub>-IdoA2SO<sub>3</sub>-GlcN6SO<sub>3</sub> (GIG). Los tres grupos sulfato presentes en dicha secuencia son imprescindibles para interactuar con el FGF-1.<sup>7</sup>

En nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo diferentes estudios para determinar la interacción y actividad mitogénica del FGF-1 con GAGs tipo Hp. Para ello se utilizaron hexasacáridos y octasacáridos sintéticos de heparina con diferente patrón de sulfatación.<sup>8</sup> Todos los GAGs utilizados presentaban el trisacárido básico (GIG) capaz de interactuar con el FGF-1. Este estudio puso de manifiesto la importancia de la distribución potencial electrostática a lo largo de la cadena carbonatada de los oligosacáridos.

Para analizar el modo de unión de oligosacáridos de Heparina y FGF-1, se realizó un estudio mediante Espectroscopía de Resonancia de Plasmón Superficial. Para ello se usaron cinco hexasacáridos<sup>9,10,11</sup> con diferente patrón de sulfatación. Mediante los experimentos de SPR y los resultados de la actividad mitogénica obtenida en años anteriores,<sup>8</sup> se llegó a la conclusión que el patrón de sulfatación era el origen de las diferencias entre la interacción y la actividad biológica.<sup>12</sup> Para aceptar esta conclusión se tuvo que asumir el papel de las interacciones electrostáticas entre los GAGs y el FGF-1 y considerar que no hay grandes diferencias estructurales entre los hexasacáridos derivados de heparina estudiados.<sup>13</sup> Además se mostró que el ensamblaje del complejo terciario (FGF-1:FGFR:Hp) es esencial para la actividad biológica (Schle y Pelegrini 2010). Sin embargo, la dimerización del FGF-1 no es imprescindible para la actividad biológica pero sí influye en la afinidad de FGF-1 con GAGs.

---

<sup>7</sup> M. Guerrini, T. Agulles, A. Bisio, M. Hricovini, L. Lay, A. Naggi, L. Poletti, L. Sturiale, G. Torri, B. Casu, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, 292, 222.

<sup>8</sup> J. Angulo, R. Ojeda, J. L. de Paz, R. Lucas, P. M. Nieto, R. M. Lozano, M. Redondo-Horcajo, G. Giménez-Gallego, M. Martín-Lomas, *ChemBioChem* **2004**, 5, 55.

<sup>9</sup> J. L. De Paz, J. Angulo, J. M. Lassaletta, P. M. Nieto, M. Redondo-Horcajo, R. M. Lozano, G. Giménez-Gallego, M. Martín-Lomas, *ChemBioChem* **2001**, 2, 673.

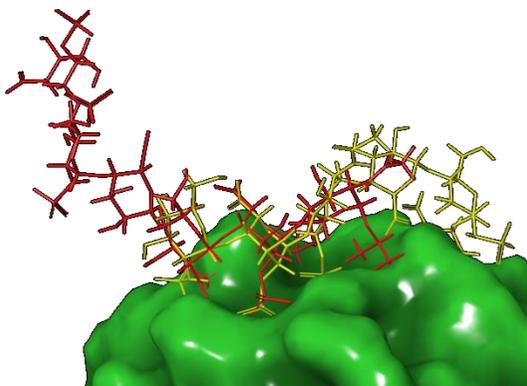
<sup>10</sup> R. Ojeda, J. Angulo, P. M. Nieto, M. Martín-Lomas, *Canadian Journal of Chemistry* **2002**, 80, 917.

<sup>11</sup> R. Lucas, J. Angulo, P. M. Nieto, M. Martín-Lomas, *Organic and Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, 2253.

<sup>12</sup> J. C. Muñoz-García, M. J. García-Jiménez, P. Carrero, A. Canales, J. Jiménez-Barbero, M. Martín-Lomas, A. Imberty, J. L. de Paz, J. Angulo, H. Lortat-Jacob, P. M. Nieto, *Glycobiology* **2014**, 24, 1004.

<sup>13</sup> J. C. Muñoz-García, J. López-Prados, J. Angulo, I. Díaz-Contreras, N. Reichard, J. L. de Paz, M. Martín-Lomas, P. M. Nieto, *Chemistry European Journal* **2012**, 18, 16319.

La importancia de la polaridad de la cadena de GAGs en la interacción con el FGF-1 se puso de manifiesto gracias a dos hexasacáridos sintéticos con el mismo patrón de sulfatación pero con la secuencia desplazada (**figura 3.1.3**). El hexasacárido que presentaba una secuencia igual que la Hp natural (representado en amarillo) provocaba la actividad mitogénica del FGF-1 mientras que con el hexasacárido con la secuencia desplazada (rojo) provocaba que el FGF-1 se mantuviese inactivo. Además, los dos mostraban diferencias en afinidad. Mediante la realización de un docking del FGF-1 con los dos hexasacáridos, se observó que la zona de unión principal del FGF-1 era la idónea para fijar la estructura de una secuencia trisacáridica G-I-G y la zona secundaria aceptaría un disacárido con secuencia G-I. Este fue el modelo propuesto con el hexasacárido con la misma secuencia que la heparina (hexasacárido representado en amarillo). Sin embargo, el otro hexasacárido (representado en rojo) se une a la zona principal de unión la misma secuencia trisacáridica pero la zona secundaria se queda libre. Esto explicaba la diferencia en la actividad mitogénica y en la interacción.<sup>12</sup>



**Figura 3.1.3** Docking realizado con la estructura tridimensional del FGF-1 y dos hexasacáridos de Hp. En amarillo el Hexasacárido con la secuencia natural de Hp, en rojo el hexasacárido con la secuencia desplazada y en verde la estructura de la proteína.

En este capítulo se va a estudiar la interacción del FGF-1 con diferentes trisacáridos conteniendo la secuencia GIG (secuencia mínima de interacción). Debido a que estos trisacáridos presentan diferente patrón de sulfatación se va a intentar determinar cómo influye el patrón de sulfatación en dicha interacción.

La conformación estructural de dichos trisacáridos fue estudiada por el Dr. Juan Carlos Muñoz mediante espectroscopía de RMN y dinámica molecular. Los trisacáridos de

heparina presentan una estructura helicoidal<sup>14</sup> al igual que oligosacáridos de mayor longitud.<sup>15</sup> El anillo central (IdoA) de estos trisacáridos presenta un equilibrio conformacional entre la conformación de <sup>1</sup>C<sub>4</sub> y conformaciones ecuatoriales cercanas a la <sup>2</sup>S<sub>0</sub> como las <sup>2,5</sup>B y <sup>5</sup>S<sub>1</sub>. Este equilibrio está influenciado por la temperatura y por la presencia de los grupos sulfato en los residuos de GlcN adyacentes a él. Aunque estos trisacáridos presentan una estructura rígida, el estudio de las uniones glicosídicas mostró un enlace rígido (anti-Ψ) para GlcN-IdoA y un enlace más flexible para IdoA-GlcN que algunos casos, dependiendo del patrón de sulfatación, permitía unas conformaciones anti-Ψ (minoritarias).<sup>13</sup>

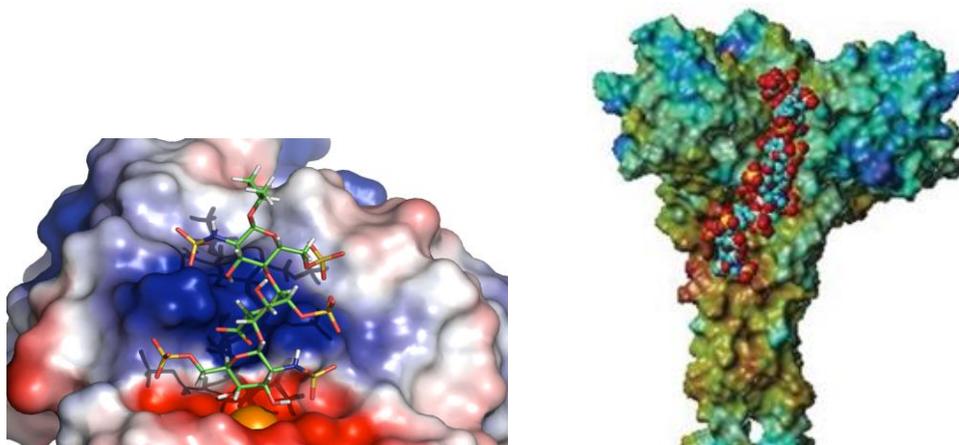
La serie de 8 trisacáridos sintéticos se estudiaron en el grupo de investigación con una proteína de membrana, la Langerina. Como ya se comentó en la introducción (capítulo 1) es una lectina tipo C, la cual interacciona con carbohidratos de forma dependiente de Ca<sup>2+</sup>. Se comprobó mediante experimentos de RMN de interacción (STD y NOESY transferido) que los trisacáridos interaccionan de forma dependiente de Ca<sup>2+</sup> ya que estos trisacáridos presentan dos grupos hidroxilos libres en el extremo no reductor<sup>16</sup> (**figura 3.1.4\_izquierda**). Esta interacción no está influenciada por el patrón de sustitución de los trisacáridos. Otros estudios que se llevaron a cabo con la Langerina fueron con GAGs derivados de Hp pero con mayor longitud, un dodecasacárido. Se obtuvo la estructura del complejo en la cual se puede observar la interacción en otro sitio de unión, independiente del ión Ca<sup>2+</sup> (**figura 3.1.4\_derecha**).

---

<sup>14</sup> B. Mulloy, M. J. Forster, C. Jones, D. B. Davies, *Biochemical Journal* **1993**, 293, 849.

<sup>15</sup> D. Mikhailov, R.J. Linhard, K.H. Mayo, *Biochemical Journal* **1997**, 328, 51.

<sup>16</sup> J. C. Muñoz-García, E. Chabrok, R. R. Vivés, A. Thomas, J. L. de Paz, J. Rojo, A. Imberty, F. Fieschi, P. M. Nieto y J. Angulo, *Journal of American Chemistry Society* **2015**, 137, 4100.



**Figura 3.1.4** Derecha) Estructura obtenida para el trisacárido persulfatado y la Langerina los cuales se unen de forma dependiente de Calcio. Izquierda) Estructura obtenida para el complejo formado por la misma proteína y un dodecasacárido derivado de Heparina el cual se une a la Langerina de forma independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Debido a los resultados tan importantes obtenidos mediante los experimentos de STD para los complejos trisacáridos-Langerina, se decidió realizar un estudio de la interacción de dicha proteína con un hexasacárido de heparina, el cual presentaba un grupo sulfato en posición 4 de su extremo no reductor. Este grupo podría bloquear la interacción con la Langerina por el  $\text{Ca}^{2+}$  provocando que se produzca dicha interacción en otro sitio de enlace de la proteína. Este sitio de unión podría ser una grieta cargada positivamente debido a los aminoácidos básicos que forman el trímero de Langerina al igual que ocurría con el dodecasacárido de Hp.

Por todo lo expuesto anteriormente, en este capítulo se va a estudiar complejos formados por GAGs derivados de Heparina con FGF-1 y Langerina.

## OBJETIVOS.

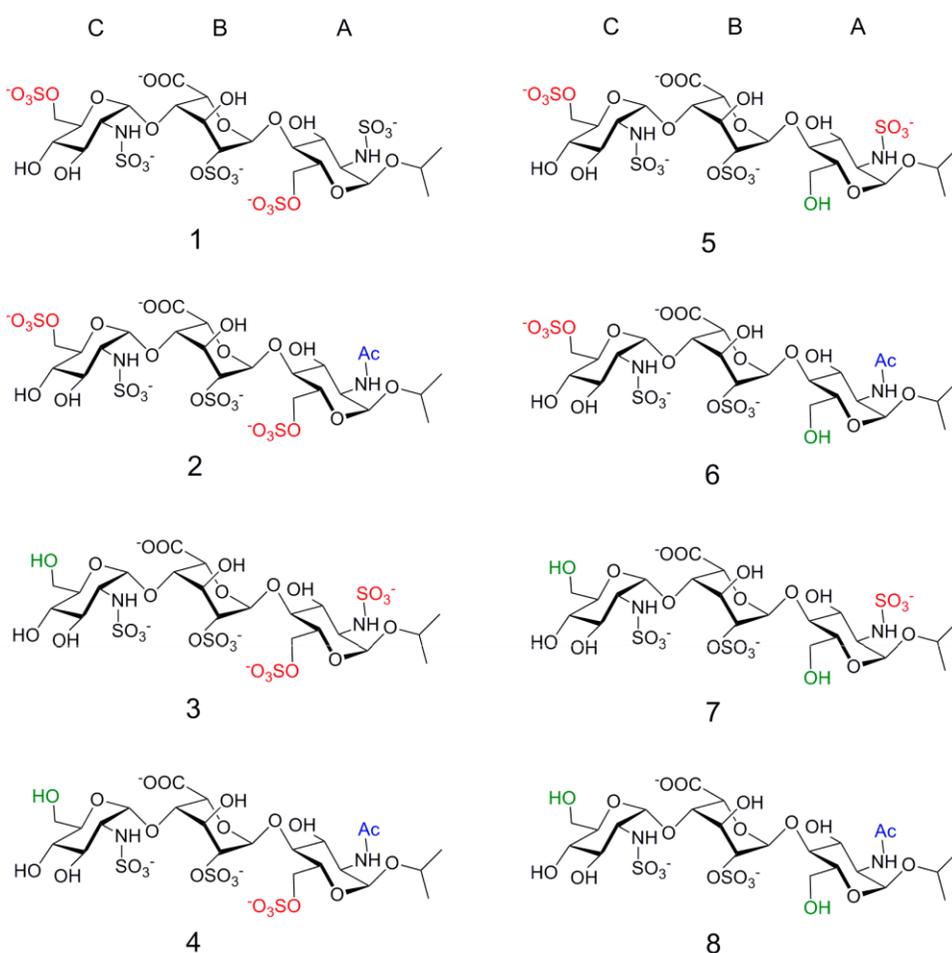
1- Estudiar la influencia del patrón de sustitución de los trisacáridos de Hp en su interacción entre el FGF-1 mediante técnicas de RMN como NOESY transferido, STD y  $T_1$ -selectivo (estas dos últimas no utilizadas hasta ahora para demostrar dicha interacción) y métodos teóricos (docking y CORCEMA-ST).

2- Con la Langerina, se pretendía estudiar el sitio de unión del Hexasacárido (el cual presenta la posición 4 del extremo no reductor bloqueado mediante un grupo sulfato) en

la zona de enlace de la proteína, determinando si esta unión es dependiente o independiente del ión  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.2 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL FGF-1 CON TRISACÁRIDOS DERIVADOS DE HEPARINA.

Para analizar la interacción del FGF-1 con trisacáridos derivados de Hp se sintetizaron ocho trisacáridos con la misma secuencia pero con diferente patrón de sulfatación.<sup>13</sup> La **figura 3.2.1** muestra los ocho trisacáridos englobados en dos series: la serie 1 contiene los trisacáridos representados a la izquierda de la imagen (del **1** al **4**) y la serie 2 engloba a los trisacáridos de la derecha (del **5** al **8**).



**Figura 3.2.1** Representación de todos los trisacáridos. La serie 1 está formada por los trisacáridos **1**, **2**, **3** y **4**. La serie 2 está formada por los trisacáridos **5**, **6**, **7** y **8**. Al anillo de GlcN en el extremo reductor se denomina anillo A, al ácido Idurónico anillo B y a la GlcN del extremo no reductor se denomina anillo C.

La diferencia entre ambas series es que la 2 (trisacáridos del **5** al **8**) no presenta ningún grupo sulfato en la posición 6 del anillo de GlcN en posición A, si se denomina como A al anillo presente en el extremo reductor. Con estas dos series se puede mostrar la influencia de ese grupo sulfato en la interacción con el FGF-1. Hay dos grupos sulfato que se mantuvieron invariantes en los ocho trisacáridos, los grupos en las posiciones 2 de los anillos B y C, ya que se consideran necesarios para interaccionar con el FGF-2. Dentro de la misma serie las posiciones sulfatadas para los anillos A, B y C van cambiando de tal forma que el trisacárido **1** está totalmente sulfatado mientras que el trisacárido **4** sólo presenta grupos sulfato en una de las dos caras en la estructura tridimensional.

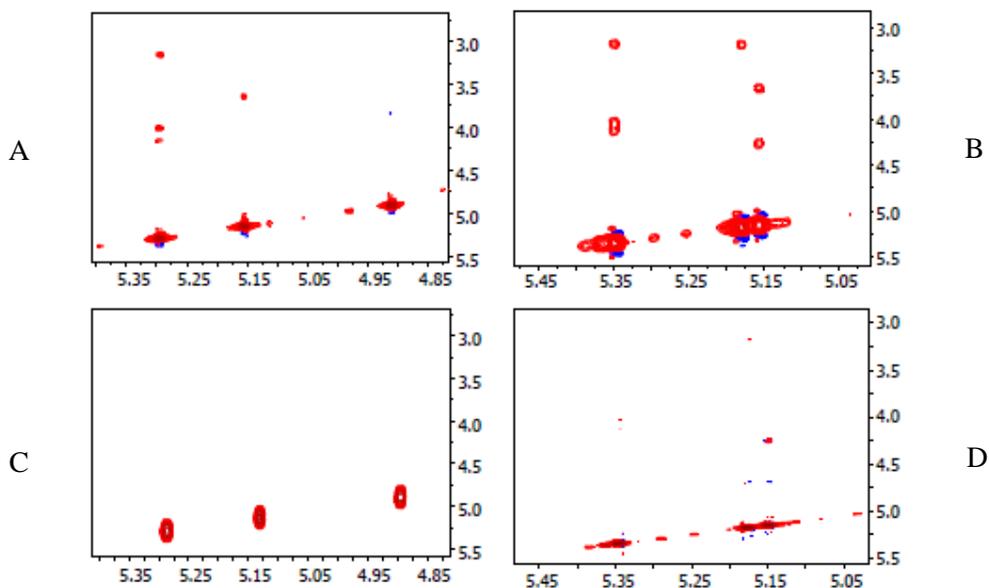
Debido a que la estructura tridimensional de los trisacáridos en su forma libre se había determinado de forma muy exacta mediante espectroscopia de RMN (NOESY) y dinámica molecular<sup>13</sup> pero con condiciones diferentes a las que se iba a llevar a cabo el estudio de los complejos con el FGF-1 se decidió realizar experimentos a 600 MHz y a 25°C para conocer con exactitud los desplazamientos químicos. Para ello se llevaron a cabo experimentos de caracterización como <sup>1</sup>H-RMN, COSY y HSQC (ver parte experimental) para los 8 trisacáridos. A continuación, se detallan los experimentos llevados a cabo para determinar la interacción proteína-ligando.

### **3.2.1 Experimentos NOESY transferido.**

El primer experimento llevado a cabo fue un NOESY transferido para determinar la conformación del ligando complejado con el FGF-1 y compararla con la del ligando libre. Además, estos experimentos proporcionarían información sobre la interacción ya que al tener un tiempo de correlación diferente el ligando libre del enlazado se podría producir un cambio de signo de los NOEs. Debido a que los trisacáridos **1** y **4** dentro de la misma serie son los que presentan una mayor diferencia en el número de grupos sulfato se decidió hacer experimentos NOESY y NOESY transferido a dichos trisacáridos. Se prepararon 4 muestras diferentes con la misma concentración de ligando 1mM pero dos de ellas contenían FGF-1 (19 µM) y otras dos no.

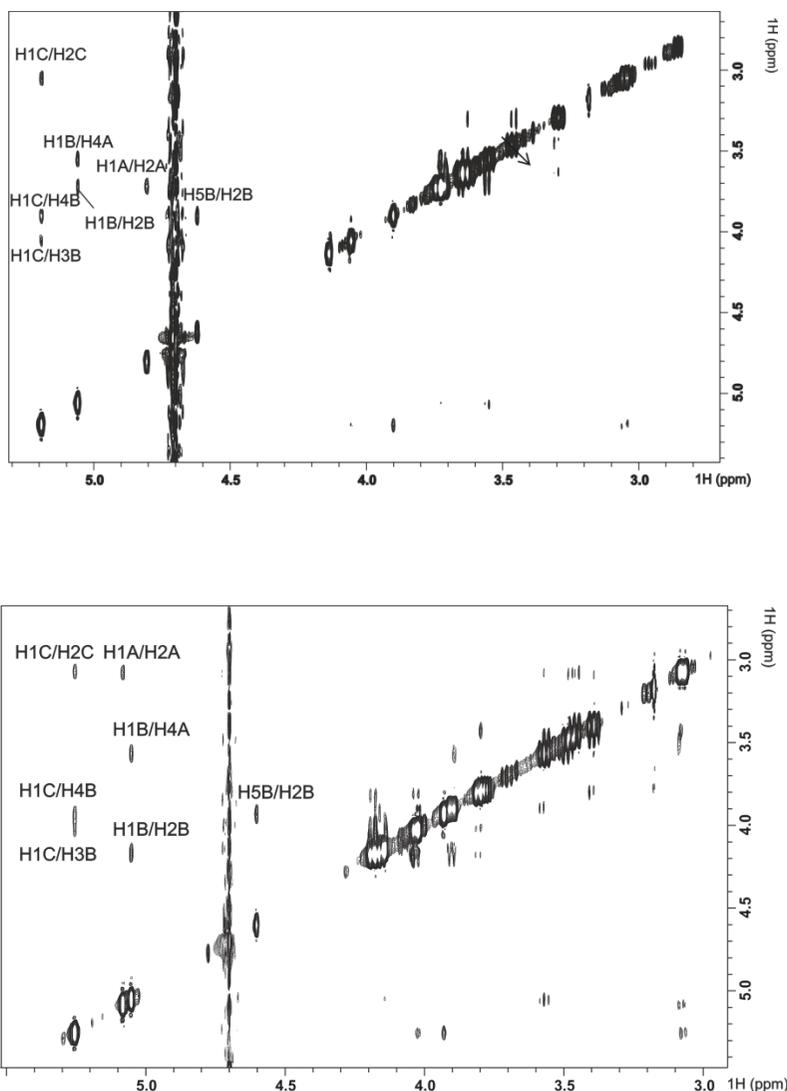
En la figura **3.2.1.1** se puede observar la comparación los espectros obtenidos para el trisacárido **4** en su forma libre (espectro C) y enlazada (espectro A) junto con los mismos experimentos para el trisacárido **1** (espectro B complejado y ligando D ligando libre). En ambos casos, se observa la aparición de picos de cruce aunque pocos intensos cuando los trisacáridos están en su estado enlazado (espectros A y B) obteniendo la

primera muestra de interacción. A 600 MHz cuando el ligando está libre no presenta NOEs debido a que se encuentra en la zona de NOE cero por el tiempo de correlación.



**Figura 3.2.1.1** Espectros obtenidos de los experimentos NOESY. Espectros A y C (para el trisacárido **4** y los espectros B y D para el trisacárido **1**. El tiempo de mezcla para los experimentos llevados a cabo con los ligandos libres fueron 500 ns y para el complejo 300 ns. Ambos realizados en un espectrómetro de 600 MHz y a 25°C.

Después de comprobar que se produce interacción entre ambos trisacáridos y el FGF-1 pero que los picos NOEs son poco intensos para obtener una estructura tridimensional del ligando enlazado se hizo un NOESY transferido a 15°C. Al bajar la temperatura se aumenta el tiempo de correlación y el equilibrio conformacional se desplaza hacia las especies más estables obteniéndose así una mayor intensidad en los picos NOEs. Así se puede obtener la estructura tridimensional del ligando cuando forma parte del complejo. La conformación del anillo de IdoA es la más importante ya que presenta un equilibrio conformacional entre las estructuras de silla ( ${}^1C_4$ ) y bote torcido ( ${}^2S_0$ ) cuando el ligando está en su forma libre. Los demás anillos muestran una conformación  ${}^4C_1$  muy estable. En la **figura 3.2.1.2** se observa el pico NOE H2B/H5B para el IdoA indicando la conformación  ${}^2S_0$ . Además, siguen apareciendo dos NOEs interglucosídicos para el enlace IdoA-GlcN (H1C/H4B y H1C/H3B). Después de estos experimentos se puede concluir que no varía la estructura tridimensional del ligando libre con la del enlazado al FGF-1.



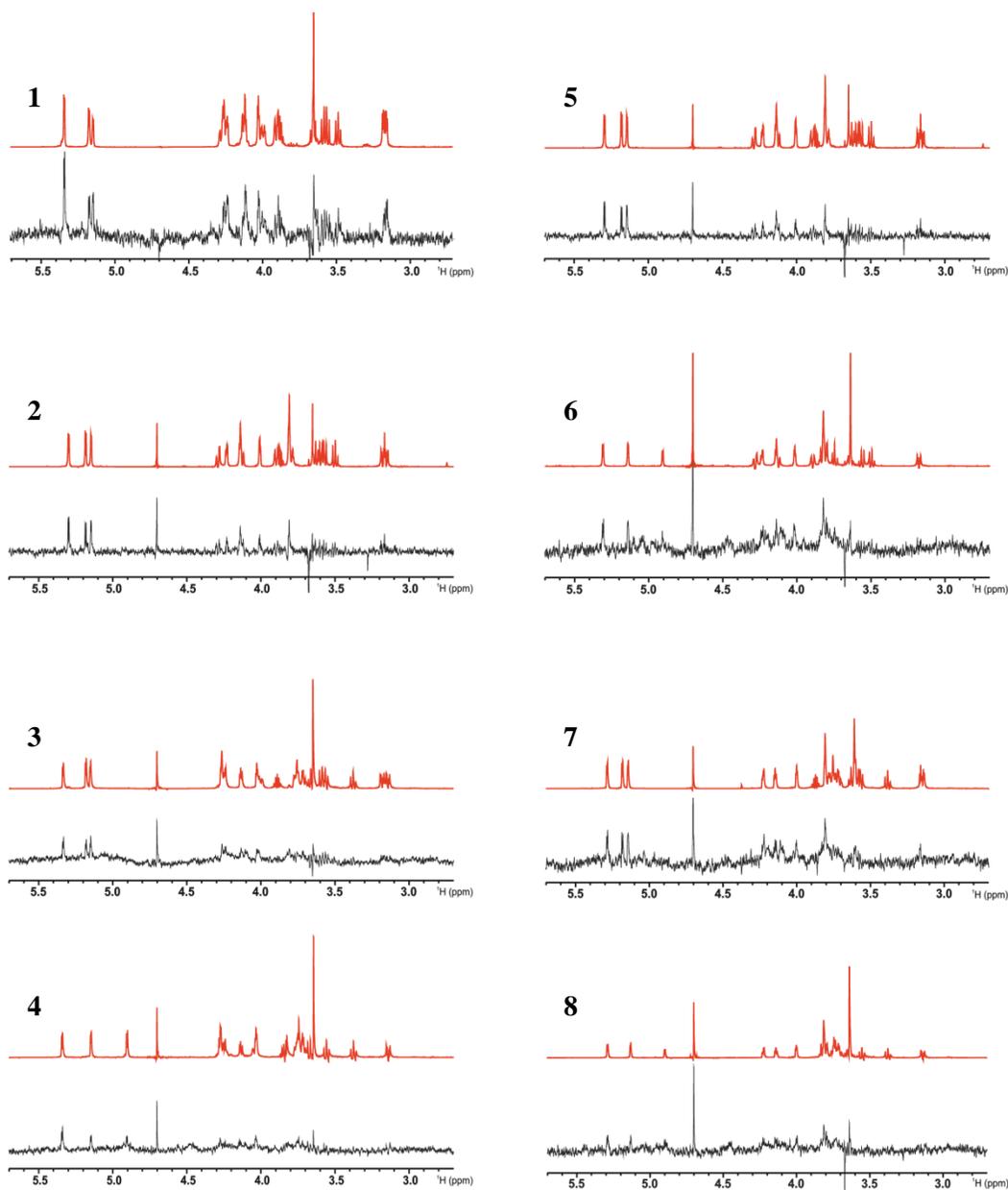
**Figura 3.2.1.2** Experimentos tr-NOESY para el trisacárido **4** (arriba) y el **1** (abajo). Tiempo de mezcla de 250 ms.

### 3.2.2 Experimentos de STD.<sup>17,18</sup>

Después se registraron experimentos de STD con una concentración de 1.6 mM de ligando y 19  $\mu$ M de proteína en 250  $\mu$ L de buffer fosfato (ver parte experimental).

Mediante esta técnica se puede obtener el mapa del epítipo de la interacción monitorizando el porcentaje de saturación que recibe cada protón del ligando. En la **figura 3.2.2.1** se puede observar dos espectros para cada uno de los trisacáridos. El espectro rojo muestra el espectro  $^1\text{H}$ -RMN (off resonance) y el espectro negro es el

espectro de STD obtenido por diferencia (ver metodología). Aunque no se pudo medir el STD de todos los protones debido al solapamiento y al poco porcentaje de saturación que presentan, el espectro de STD (de diferencia) refleja que prácticamente a todos los protones le llega saturación desde la proteína.



**Figura 3.2.2.1** Espectros obtenidos de los experimentos de STD. Los espectros rojos son  $^1\text{H}$ -RMN y los negros son  $^1\text{H}$ -STD para los 8 trisacáridos obtenidos a un tiempo de saturación de 4 s y 2048 escanes de 16384 puntos cada fid.

A partir de las curvas que representan el crecimiento del STD con respecto al tiempo de saturación se obtiene el porcentaje de  $STD_0$  (**figura 3.2.2.2**). En estas gráficas sólo se representan los protones anoméricos para cada uno de los 8 trisacáridos debido al poco porcentaje de saturación encontrado en todos los protones y sobretodo, al solapamiento entre ellos. De forma cualitativa podemos observar que las curvas de crecimiento de la serie 2 (derecha) presentan un menor porcentaje de saturación para dichos protones a lo largo del tiempo de saturación. Esto puede sugerir una evidencia clara de la importancia de la sustitución del grupo hidroxilo por un grupo sulfato en la posición 6 del anillo A en la interacción con el FGF-1. Se pueden comparar las gráficas dentro de la misma serie y determinar la influencia de la pérdida de los grupos sulfatos en la interacción. Se observa que las gráficas A y B correspondiente a los trisacáridos **1** y **2** representan unas curvas de crecimiento con valores de STD ligeramente más altos que las C y D para los tetrasacáridos **3** y **4** respectivamente. Esto parece indicar que hay un modo de unión diferente debido a la presencia de grupos sulfato ya que al aumentar estos grupos, los trisacáridos pueden interactuar con el FGF-1 mediante sus dos caras, superior e inferior. Sin embargo, los trisacáridos **3** y **4** sólo interactuarían por la cara que presenta tres grupos sulfato. En los trisacáridos de la serie 2, no se produce esta diferencia en los valores de STD excepto para el trisacárido **8** cuyos únicos protones medidos indican una saturación mayor que para los demás trisacáridos indicando, como era de esperarse, un modo o sitio de unión diferente ya que sólo presenta dos grupos sulfato. Si se comparan las gráficas del trisacárido **4** que el **8** por lo que se sigue suponiendo que el **8** se une en un sitio diferente de los demás. Además, también se puede deducir que los trisacáridos de la serie 2 utilizan para la interacción los grupos sulfatos en posición 2 de los anillos B y C independientemente de que tengan más grupos sulfatos en otros anillos o en la otra cara del eje longitudinal. Esto está de acuerdo con los estudios previos realizados con los hexasacáridos de heparina mediante SPR (Angulo et al. 2014).

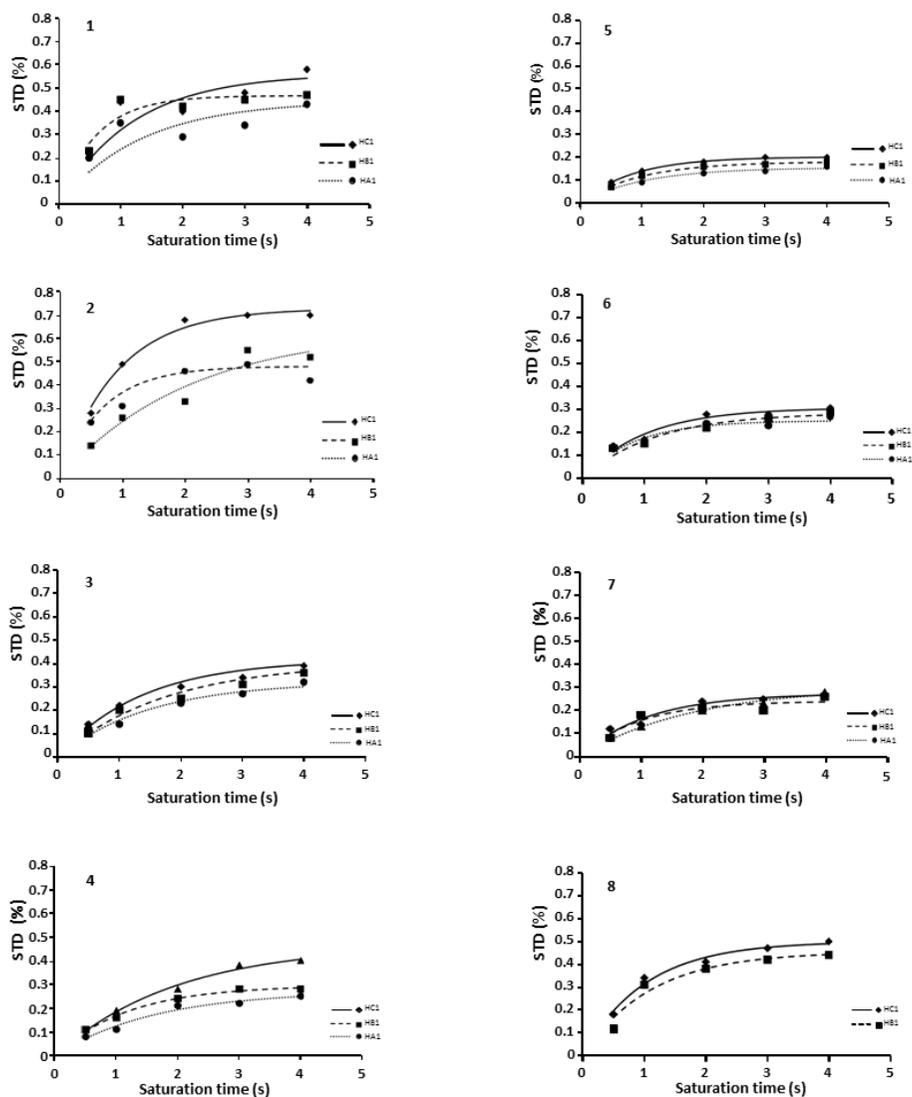


Figura 3.2.2.2 Representación de las curvas de crecimiento del STD para los 8 trisacáridos.

Debido a los valores de  $STD_0$  tan bajos obtenidos para todos los trisacáridos, menos de 1% (tabla 3.2.2.1), se puede indicar que el experimento de STD realizado para estos compuestos no es el mejor método para determinar la interacción proteína-ligando. Esto puede explicarse debido a que a los protones de los anillos A, B y C quedan bastante lejos de la proteína indicando una gran distancia entre ellos y la superficie de la proteína

por la interferencia de los grupos sulfato. Por ese motivo se puede suponer que la transferencia de saturación desde la proteína a los protones anoméricos no es demasiado grande. A pesar de eso, los valores de STD obtenidos para los trisacáridos del **1** al **4** muestran una interacción compatible con la zona principal del FGF-1 con tres grupos sulfato orientados hacia la superficie de la proteína. En color negro se muestran los valores de STD<sub>0</sub> absolutos y en rojo los valores de STD<sub>0</sub> relativos. En nuestro caso los valores de STD<sub>0</sub> relativos siguen una tendencia más o menos uniforme a lo largo de los trisacáridos lo que indica que los tres anillos participan en la interacción. Estos valores varían desde un 30% a un 100% (de forma general) y no se concentran los valores más bajos de STD<sub>0</sub> para ninguno de los anillos. Si comparamos los valores de STD<sub>0</sub> absolutos de los trisacáridos de la serie 1 se observan que los trisacáridos **1** y **2**, de forma general, presentan un de STD<sub>0</sub> algo mayor que los trisacáridos **3** y **4**. Como ya se ha mencionado de forma más “*cuantitativa*” la interacción por ambas caras de los trisacáridos **1** y **2**, además de la poca influencia en la interacción del grupo sulfato en posición 6 del anillo C. En la serie 2 no se observan diferencias cuando los trisacáridos presentan o no ese grupo sulfato.

	H1A	H1B	H1C
Trisacárido 1	0.28/66	0.34/81	0.42/100
Trisacárido 2	0.11/14	0.36/46	0.34/31
Trisacárido 3	0.17/72	0.23/100	0.20/88
Trisacárido 4	0.17/67	0.25/100	0.27/94
Trisacárido 5	0.07/100	0.06/82	0.06/87
Trisacárido 6	0.08/35	0.12/56	0.12/53
Trisacárido 7	0.18/74	0.08/35	0.11/47
Trisacárido 8	-	0.18/32	0.19/33

**Tabla 3.2.2.1** Representación de los valores de STD<sub>0</sub> absolutos (negro) y relativos (rojos) para los protones anoméricos para todos los trisacáridos obtenidos a 25°C.

Con los datos obtenidos de los experimentos de STD no se pueden obtener tantas conclusiones experimentales como las obtenidas para los mismos trisacáridos en su interacción con la Langerina. Hay varios motivos que pueden explicar esta diferencia.

Primero, los trisacáridos se pueden unir a varias zonas del FGF-1, en principio se han distinguido dos zonas en la que interaccionan compuestos de al menos seis residuos. La zona principal, capaz de unir un trisacárido con tres grupos sulfato, y la secundaria que lo hace solo con dos. Por otro lado, los trisacáridos **1** y **2** pueden interaccionar por sus dos caras alternativamente lo que conduce a un reparto de la magnetización entre estas

dos formas. Otro factor a tener en cuenta es la densidad de protones en la interfase entre el ligando y el receptor. En este caso, debido a la naturaleza de la interacción, totalmente diferente a la Languerina, hay una distancia importante entre los protones del carbohidrato y las cadenas de la proteína debido a los grupos sulfato orientados hacia la proteína. Finalmente, el menor tamaño del FGF también influye al tener una relajación menos eficaz que la Languerina, una proteína de membrana.

### 3.2.3 Experimentos T<sub>1</sub> selectivo.<sup>20</sup>

Para intentar obtener más datos experimentales del comportamiento de los trisacáridos frente al FGF-1 se obtuvieron las constantes de disociación de los trisacáridos con el FGF-1. Ello se llevó a cabo mediante el método de T<sub>1</sub> selectivo a diferentes concentraciones por RMN. Para comprobar que estos experimentos podían servir para este propósito se realizaron tales experimentos con una proteína modelo, la WGA. Esta proteína presenta una constante de disociación teórica con GlcNAc de 2.5 mM obteniéndose de forma experimental 2.1 mM al aplicar el método basado en la variación del T<sub>1</sub> corroborando la fiabilidad del método. Con este tipo de experimento (ver capítulo 2) calculamos los valores de las constantes de disociación de todos los trisacáridos con el FGF-1 representados en la **tabla 3.2.3.1**. Se llevaron a cabo 10 experimentos para diferentes relaciones proteína-ligando. Los tiempos utilizados para medir el T<sub>1</sub> selectivo fueron 0.001, 0.05, 0.2, 0.4, 0.8, 2, 5, 8 y 10 s con un tiempo de relajación de 10 s. En todos los experimentos se mantuvo constante la concentración de proteína a 19 μM y se fue añadiendo trisacárido sólido para obtener concentraciones de 80, 160, 320, 480 y 640 μM. Además se llevaron a cabo los mismos experimentos sólo con trisacárido (sin proteína) a 500 μM. El buffer utilizado es el mismo que para todos los demás las muestras. Como se puede observar la cantidad de ligando necesaria para este experimento es mucho menor que la cantidad de ligando necesaria para calcular la constante de disociación mediante experimentos de STD. Con el programa Dynamic Center se obtuvieron los valores de T<sub>1</sub> selectivo para cada concentración representados en la **figura 3.2.3.1** y, a partir, de un ajuste exponencial se los valores de T<sub>1</sub> se obtiene el valor de K<sub>D</sub> (**tabla 3.2.3.1**).

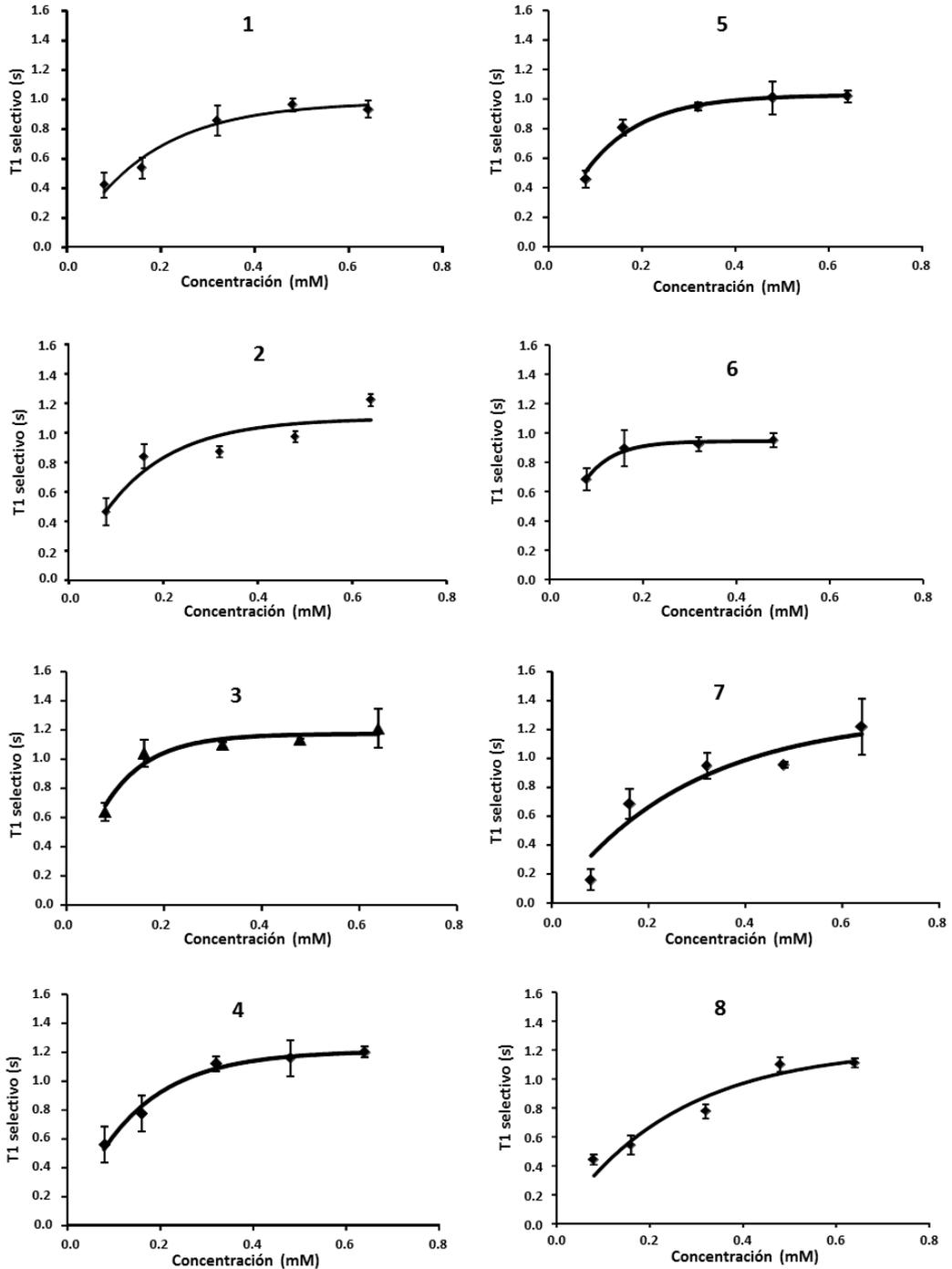


Figura 3.2.3.1 Representación de la curva de crecimiento del T<sub>1</sub> selectivo al aumentar la concentración de ligando.

Todos los datos obtenidos para las constantes de disociación son del orden de bajo  $\mu\text{M}$ , lo que nos indica una interacción fuerte. Esto está de acuerdo con los trabajos publicados por Ornitz et al. Si se compara la serie 1 y 2 se observa que las  $K_D$  obtenidas para ésta última serie son mayores que para la serie 1. Esto indica una interacción mayor para los trisacáridos con grupo sulfato en posición 6 del anillo A, lo que está de acuerdo con los valores de  $\text{STD}_0$ . En el caso de la serie carente del grupo 6-*O*-sulfato en el anillo A los valores experimentales de afinidad son muy dispersos y no es posible racionalizarlos empleando un único modo de unión común para todos los oligosacáridos.

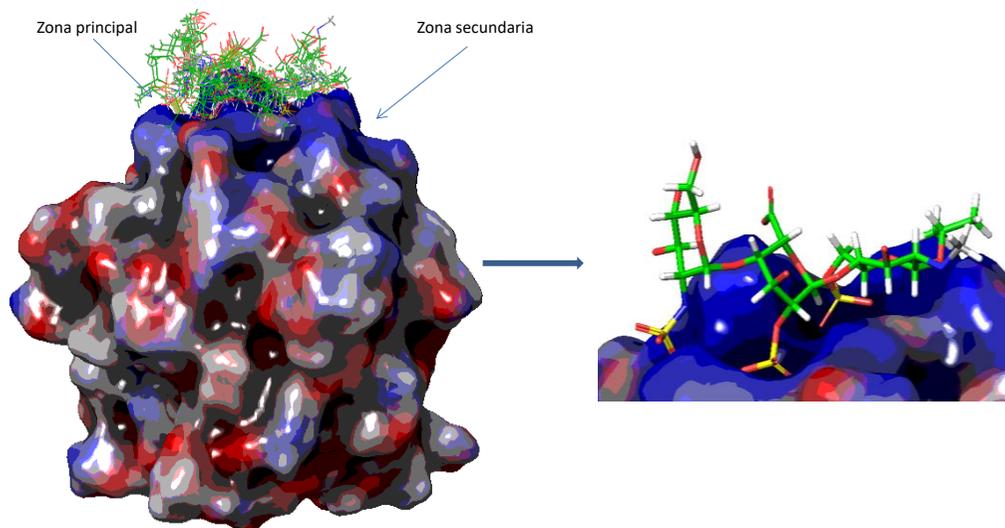
Trisacárido	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	Trisacárido	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
1	$49.2 \pm 0.3$	5	$50.6 \pm 0.1$
2	$26.1 \pm 0.7$	6	$180.9 \pm 5.5$
3	$15.4 \pm 0.4$	7	$46.7 \pm 0.9$
4	$84.7 \pm 0.4$	8	$132.4 \pm 1.8$

**Tabla 3.2.3.1** Tabla que representa los valores de  $K_D$  obtenidos para cada uno de los trisacáridos.

### 3.2.4 Docking Molecular.<sup>23</sup>

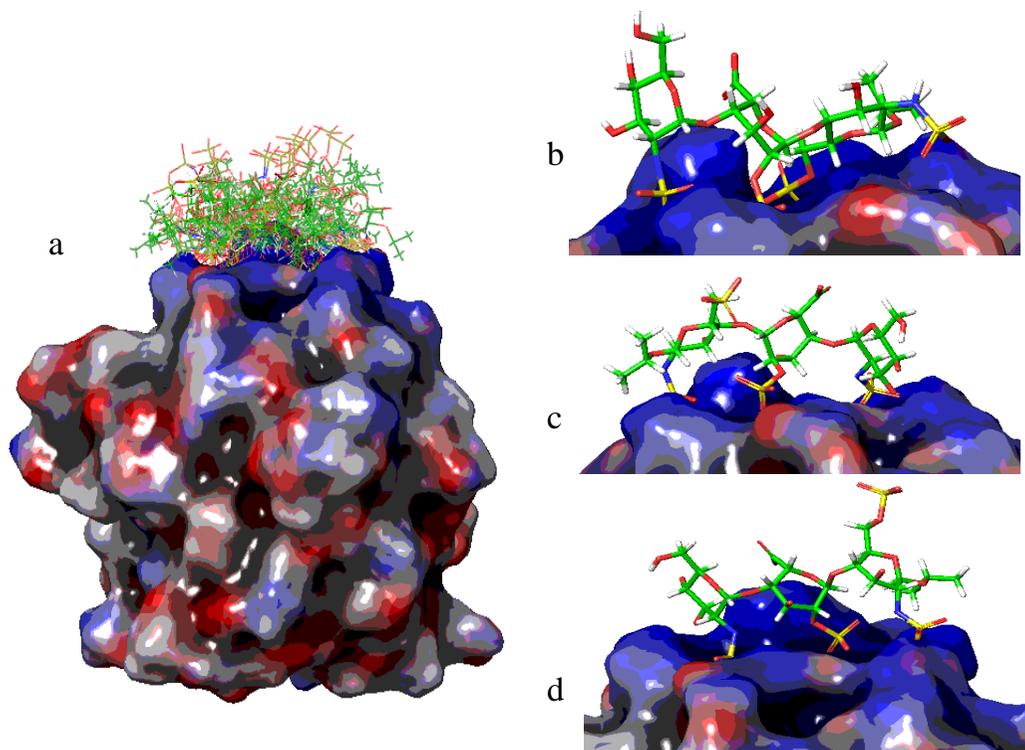
Para obtener una estructura tridimensional del complejo e intentar complementar los datos experimentales obtenidos por RMN se llevó a cabo un docking molecular de todos los trisacáridos con el FGF-1 (ver parte experimental). Para ello se usó el módulo de Glide implementado en maestro. Debido a que la zona principal del FGF-1 donde interacciona con los GAGs es la que tiene la capacidad para interaccionar con una secuencia trisacarídica G-I-G, el grid de 16 Å utilizado para la realización del docking se centró en esta zona. Primero, se van a analizar los resultados obtenidos para la serie 1. La **figura 3.2.4.1** representa las estructuras superpuestas obtenidas del docking para el trisacárido 4. Se puede observar que todas las poses se encuentran en la zona principal de la proteína, como era de esperarse. A la derecha, en la misma figura se observa una estructura encontrada para el complejo. Se han agrupado todas las estructuras encontradas en función de la posición de los grupos sulfatos que interaccionan con la proteína. En este caso, sólo se obtiene una estructura del complejo diferente ya que se ha descartado las estructuras que presentan el grupo carboxilo del anillo de IdoA hacia la proteína debido a que esta interacción no es real según estructuras del complejo obtenidas previamente mediante RMN y rayos X (2ERM y 2AXM). Como se puede observar la estructura para el complejo obtenida presenta los tres grupos sulfato del

ligando orientados hacia la proteína con la misma secuencia que se muestra en la estructura de resonancia 2ERM.



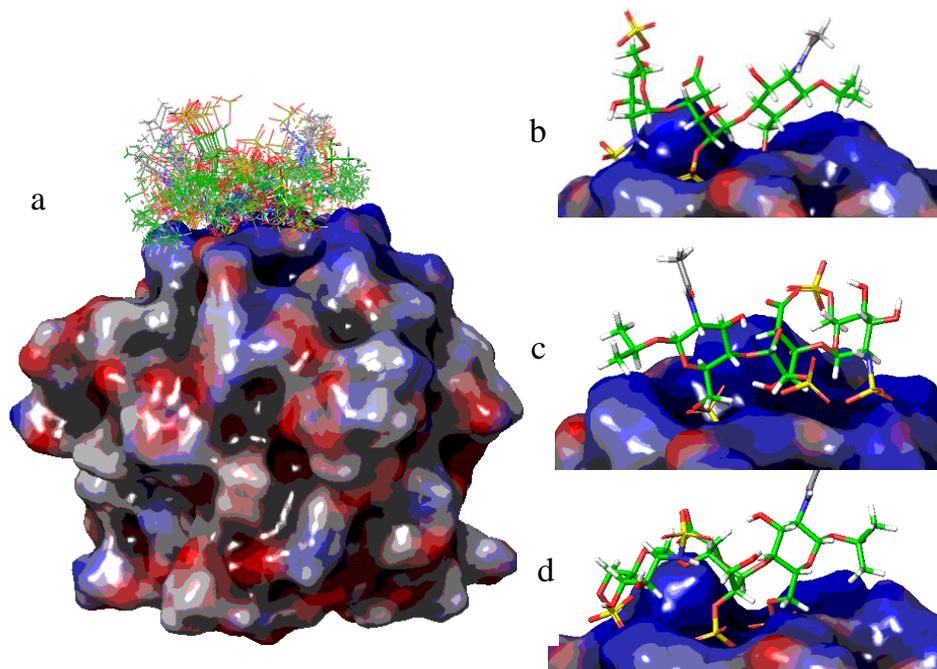
**Figura 3.2.4.1** Figura representativa del docking para el trisacárido **4**. En la parte de la izquierda se presenta el FGF-1 con superficie electrostática y la superposición de los trisacárido de menor energía interactuando en la zona principal de la proteína. A la derecha se representa una de las estructuras del ligando encontradas en el docking.

Para el trisacárido **3** que contiene un grupo sulfato más en el anillo A, se obtuvo el mismo resultado (**figura 3.2.4.2**). Todas las estructuras obtenidas se encuentran en la zona principal de la proteína pero en este caso se muestran varias estructuras diferentes. La estructura a) representada en dicha figura es la superposición de todas las estructuras obtenidas del docking molecular. La b) representa el ligando con la misma secuencia que la estructura complejada 2ERM y la c) y d) son estructuras en las que el enlace interglucosídico entre los anillos B y A rota hacia una disposición anti orientando el grupo sulfamato del anillo A hacia la proteína. Según los estudios realizados de los trisacáridos en su forma libre y complejada mediante RMN estas estructuras no podían ser reales.

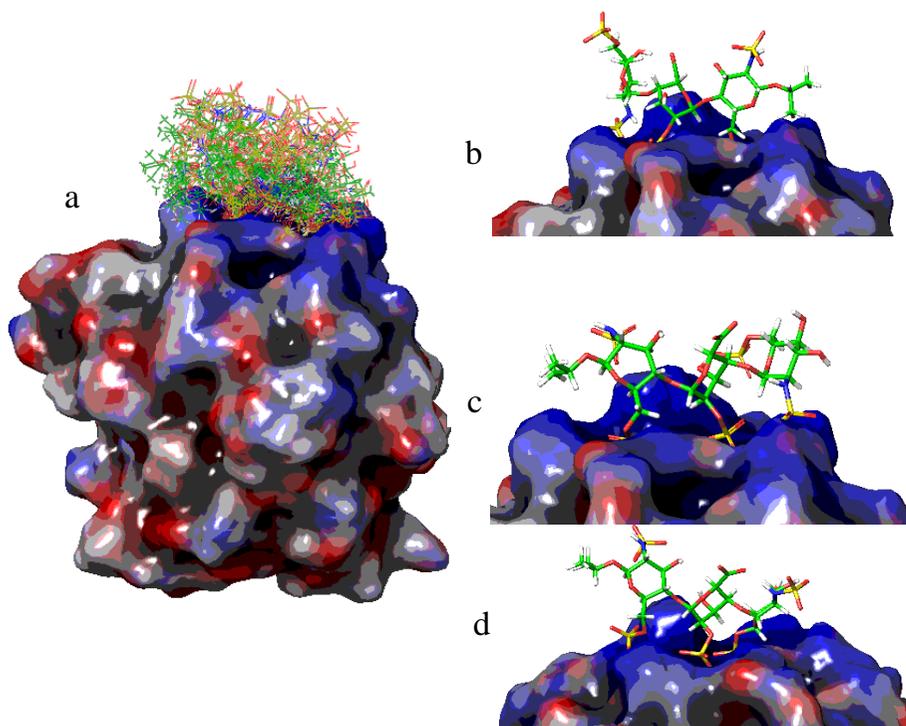


**Figura 3.2.4.2** Representación de las estructuras obtenidas del docking molecular. a) Representación de las estructuras de más baja energía obtenidas para el docking molecular. b, c y d) tres estructuras diferentes del docking en las cuales se produce un cambio en la orientación de la secuencia o un cambio en los grupos sulfatos que interaccionan para el trisacárido **3**.

Sin embargo, para los trisacárido **1** y **2** se obtuvieron muchas más combinaciones posibles ya que presentan más grupos sulfato. El grupo sulfato en posición 2 del anillo C es importante para la formación del complejo 2:1, FGF-1:Trisacárido. Los resultados del docking para estos dos trisacáridos (**1** y **2**) son representados en las **figuras 3.2.4.3** y **3.2.4.4** respectivamente. Una estructura del ligando obtenida es como la estructura cristalográfica obtenida en estudios previos con código pdb 2AXM (**figura 4.2.4.3 b**). La misma estructura aparece en el resultado del docking para el trisacárido **1**. Esto pone de manifiesto que es posible pensar que la diferencia en las interacciones entre los trisacáridos **3** y **4** y **1** y **2** se puede deber a modos de unión diferentes y se pone de manifiesto la importancia del sulfato en posición 6 del anillo C.

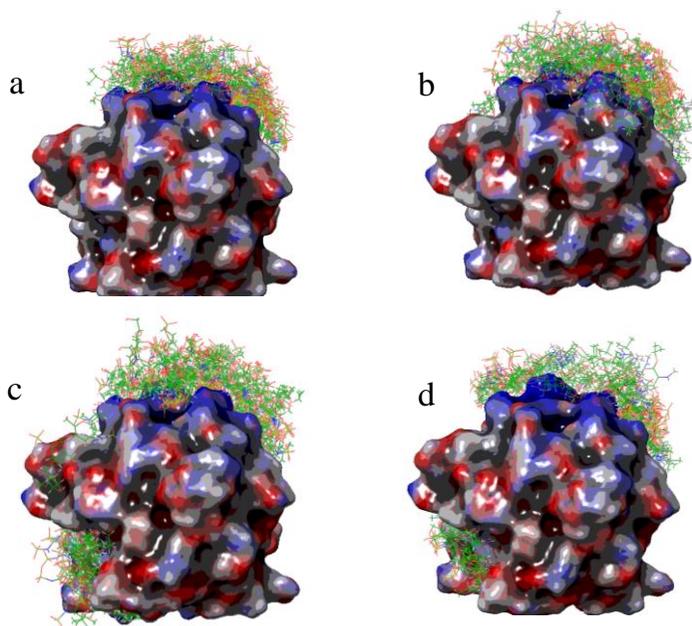


**Figura 3.2.4.3** Representación de las estructuras obtenidas del docking molecular. a) Representación de las estructuras de más baja energía obtenidas para el docking molecular. b, c y d) tres estructuras diferentes del docking en las cuales se produce un cambio en la orientación de la secuencia o un cambio en los grupos sulfatos que interaccionan para el trisacárido **2**.



**Figura 3.2.4.4** Representación de las estructuras obtenidas del docking molecular. a) Representación de las estructuras de más baja energía obtenidas para el docking molecular. b, c y d) tres estructuras diferentes del docking en las cuales se produce un cambio en la orientación de la secuencia o un cambio en los grupos sulfatos que interactúan para el trisacárido **1**.

Para la serie 2 las estructuras obtenidas son orientadas en diferentes zonas de la proteína por lo que no se representan las estructuras de las poses de menor energía y se representa solamente la superposición de las estructuras en las diferentes zonas del FGF-1 (**figura 3.2.4.5**). El complejo a) es la representación del resultado del docking con el trisacárido **5**, el b) es el complejo del trisacárido **6**, el c) es el complejo para el trisacárido **7** y por último, el c) es el complejo representativo de la interacción del trisacárido **8** con FGF-1.



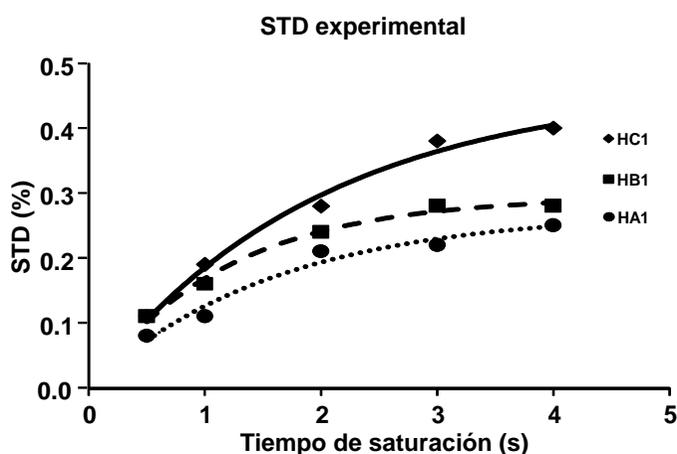
**Figura 3.2.4.5** Representación de las estructuras de los trisacáridos superpuestas sobre el FGF-1. La figura a) corresponde al docking del trisacárido **5**, la b) corresponde al complejo con el trisacárido **6**, la c) corresponde al trisacárido **7** y, por último, el trisacárido **8** interaccionan con FGF-1 se representa en la figura d).

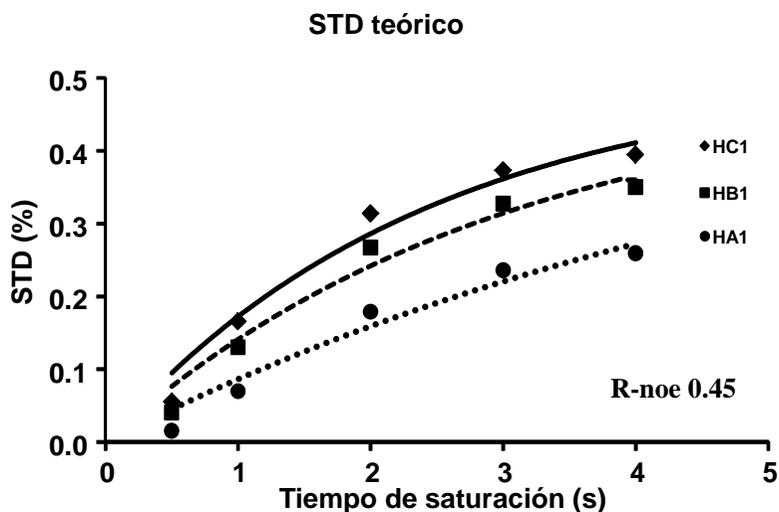
Este docking fue llevado a cabo con un grid con unas dimensiones más grandes que la serie 1 debido a que los 4 trisacáridos sólo presentan 2 sulfatos en una de las caras y era posible su interacción en otros sitios de unión del FGF-1. Por eso, el grid aplicado era con dimensiones iguales a la proteína para que los trisacáridos puedan mostrar total libertad de movimiento y se unan a la zona más adecuada para tal interacción. De esta forma se obtuvieron estructuras lejos del sitio de interacción principal confirmando la importancia del grupo sulfato en posición 6 del anillo A en la interacción con el FGF-1. Así los trisacáridos **7** y **8** presentan interacción en una zona adicional mientras que los trisacáridos **5** y **6** no. La interacción en esta zona puede provocar que los valores de  $STD_0$  obtenidos para estos dos trisacáridos no sean muy tan diferentes con los dos trisacáridos semejantes de la serie 1. Sin embargo, para los trisacáridos **5** y **6** sí muestran más influencia en las curvas de crecimiento del STD cuando presentan o no grupos sulfato debido a que no se unen a la zona adicional. Además, el trisacárido **8** no presenta ninguna estructura en la zona principal debido a que sólo tiene dos sulfatos. Los tres trisacáridos restantes de la misma serie sí presentan estructuras en la zona principal y en la secundaria. Estas diferentes zonas de unión puede justificar que los valores de  $K_D$  medidos experimentalmente para la serie 2 y los valores de  $STD_0$  muy poco diferentes

para los trisacáridos **3** y **4** y **7** y **8**. Cuando se aplicó este grid más grande a los trisacáridos de la serie 1, estos se orientaron en las dos zonas de interacción del FGF-1, la principal y la secundaria aunque mayoritariamente en la principal. De los cuatro trisacáridos de la serie 1 ninguno presentó estructuras en la zona adicional indicando que posiblemente ese sitio de unión sea real para los trisacáridos **7** y **8**.

### 3.2.5 CORCEMA-ST.<sup>23</sup>

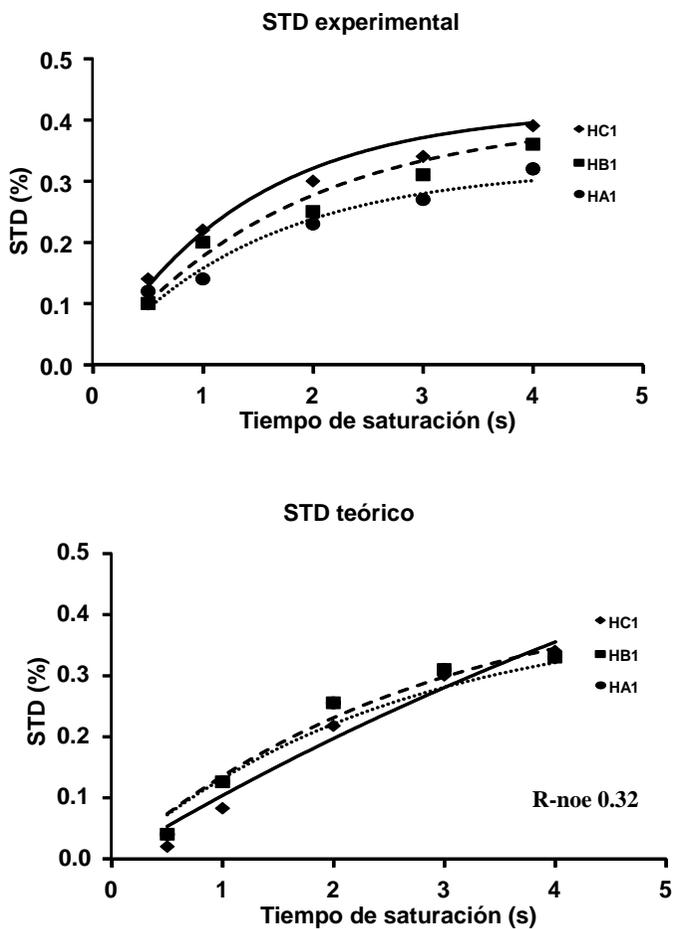
Para complementar la parte experimental y teórica, se midieron los valores de  $STD_0$  teóricos. Para ello, se utilizó CORCEMA-ST. En la **figura 3.2.5.1** se muestra las gráficas de  $STD_0$  experimentales (arriba) y teórica (abajo) para el trisacárido **4**. Como input se utilizó la estructura obtenida del docking molecular representada en la **figura 3.2.5.1**. Además, se muestra la estructura utilizada en la **figura 3.2.5.2**. En naranja se representan los aminoácidos que están más cerca del ligando y la estructura secundaria de la proteína se muestra en azul. Según los resultados las curvas de crecimiento obtenidas tanto experimentales como teóricas son parecidas con un R-NOE de 0.45 indicando que los valores de  $STD_0$  teóricos son representativos ya que está por debajo de 0.5 que es el límite aceptado. Esta estructura del complejo obtenida mediante docking molecular representa una estructura semejante a la obtenida para un hexasacárido con código 2ERM indicando que el modo de unión del trisacárido **4** con los tres sulfatos orientados hacia la proteína es la adecuada.



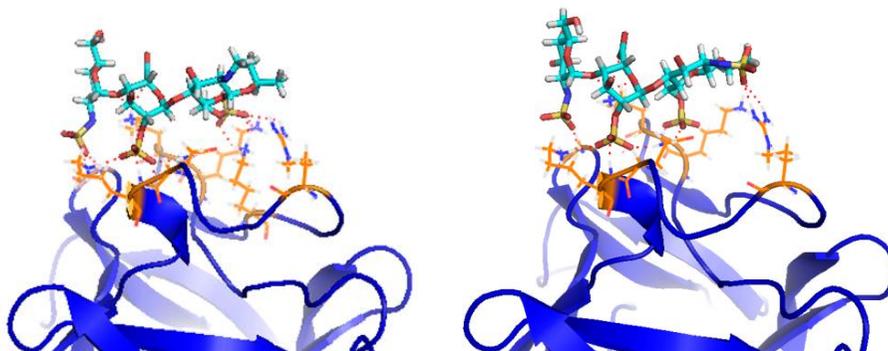


**Figura 3.2.5.1** Curvas de crecimiento del STD experimental (arriba) y teórico obtenido mediante CORCEMA-ST (debajo). Factor R-NOE 0.45 para el trisacárido **8**.

Se llevó a cabo CORCEMA-ST para el complejo formado con el trisacárido **3** con todas las estructuras diferentes encontradas como resultado del docking y la única con la que se obtuvo un R-NOE menor de 0.5 fue con la que presentaba los mismos grupos sulfato orientados hacia la proteína que el trisacárido **4** obteniéndose así un R-NOE de 0.32 (**figura 3.2.5.2**). Por lo que se puede sugerir que según los datos experimentales y teóricos que la estructura del complejo mostrada como a) en la **figura 3.2.4.2** es la estructura real del complejo FGF-1-trisacárido **3**. En la cual la adición de un grupo sulfato en posición 2 de la GlcN A no es de vital importancia en la interacción del ligando con la proteína, lo que estaría de acuerdo con los valores de STD experimentales en ambos casos.



**Figura 3.2.5.2** Curvas de crecimiento del STD experimental (arriba) y de teórico (abajo) obtenido de CORCEMA-ST con un factor R-NOE de 0.32.



**Figura 3.2.5.3** Representación de las dos estructuras de los complejos con los que se ha realizado CORCEMA-ST para el trisacárido **8** (izquierda) y **7** (derecha). En azul se representa la estructura de la proteína.

Se repitió CORCEMA-ST con las mismas condiciones para los demás trisacáridos de la serie 1. Debido a los diferentes modos de unión de los trisacáridos **1** y **2** por el aumento de los grupos sulfato no se pudo obtener resultados de STD teóricos coincidentes con los experimentales ya que se puede producir bastantes combinaciones de estructuras y CORCEMA-ST sólo se ha aplicado para sistemas como mucho duales (con dos modos de unión).

Para la serie 2, el docking molecular indicaba varias zonas de unión, la principal, secundaria y una adicional. Debido a todas esas zonas de unión no se han encontrado valores teóricos semejantes a valores experimentales y no se pudo determinar una única estructura para los complejos.

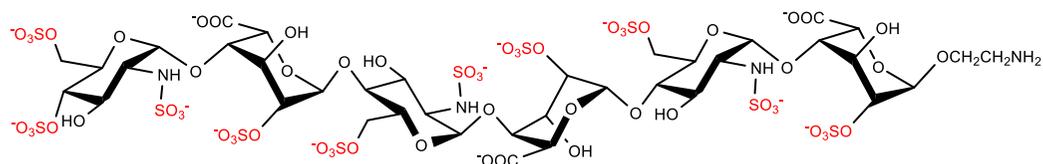
### **3.3 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA LANGUERINA Y UN HEXASACÁRIDO (HEXA 4S) DERIVADO DE HEPARINA.**

Dentro de los estudios de interacción proteína-ligando de nuestro grupo uno de los objetivos tradicionales han sido las C-lectinas. Entre estas, la Langerina ha constituido una de las más frecuentes. Recientemente se estudió la interacción entre los dominios extracelulares de Langerina y la quimioteca de trisacáridos descrita en el epígrafe anterior. En el presente epígrafe se describen los estudios sobre la interacción entre un hexasacárido y la Langerina.

#### **3.3.1 Estudio tridimensional del hexasacárido libre.**

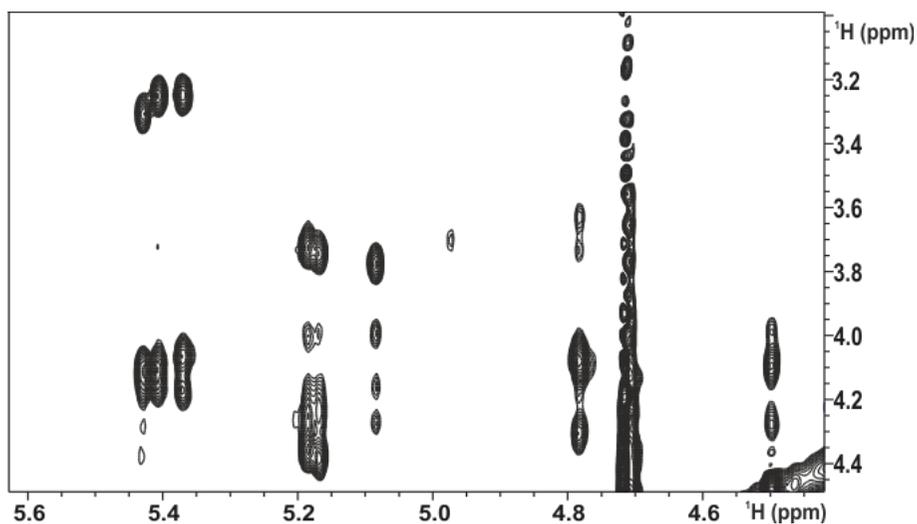
Para poder investigar las bases moleculares que gobiernan la interacción entre este GAGs y la Langerina primero se determinó la estructura tridimensional del hexasacárido libre (**figura 3.3.1.1**). Para ello, se analizaron los NOEs experimentales,  $^3J_{HH}$  y dinámicas moleculares. Conociendo la estructura tridimensional del ligando libre se conocería la influencia en la estructura del grupo sulfato adicional en la posición 4 de la GlcN del extremo no reductor. Para analizar si el grupo sulfato impedía la interacción con la Langerina empleando un ión  $Ca^{2+}$ , se realizaron experimentos de STD para el hexasacárido en presencia de proteína con y sin iones  $Ca^{2+}$ . Por último, se obtuvo una estructura del complejo mediante docking con la cual se realizó CORCEMA-ST para complementar las curvas de crecimiento del STD obtenidas de forma experimental con las obtenidas mediante CORCEMA-ST.

Los experimentos llevados a cabo para la caracterización del hexasacárido 4S en su forma libre fueron 2D-TOCSY y 2D-NOESY a 700 MHz en un espectrómetro Bruker Avance III. Para la realización de ellos se preparó una muestra de 300  $\mu\text{L}$  de buffer Tris deuterado (150 mM de NaCl, 4 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM de d-Tris, pD 8) y 10 mM de EDTA para secuestrar los cationes divalentes. La concentración del ligando fue de 0.947 mM.



**Figura 3.3.1.1** Representación de la estructura tridimensional del Hexasacárido 4S el cual presenta un grupo sulfato adicional en la posición 4 del extremo no reductor.

El experimento bidimensional NOESY a 300K refleja la conformación para los seis anillos que forman el hexasacárido 4S (**figura 3.3.1.2**). A partir de los anoméricos de los anillos de GlcN se observan los NOEs indicativos de una conformación  ${}^4\text{C}_1$ . Los NOEs obtenidos para los anillos de IdoA tanto A como B y C son H2X/H5X siendo estos indicativos de la participación de la conformación  ${}^2\text{S}_0$  en el equilibrio.



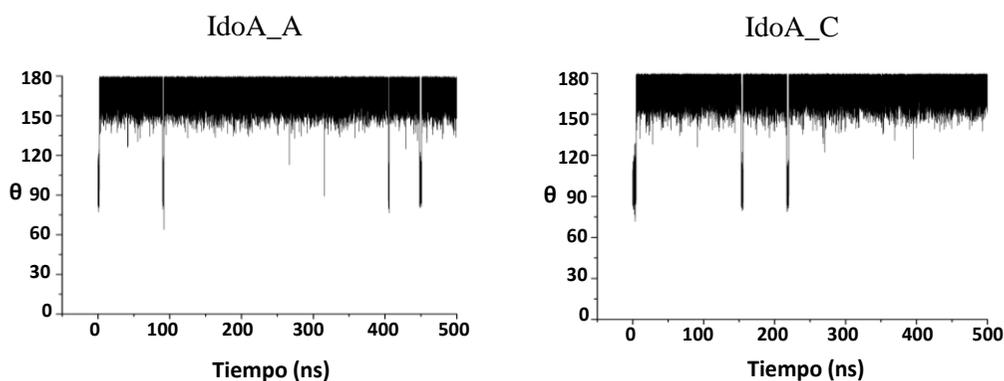
**Figura 3.3.1.2** Espectro bidimensional NOESY de 500 ns obtenido a 300K y 700 MHz a partir de la muestra del Hexasacárido 4S con un exceso de EDTA a 32 escanes y 256 fides.

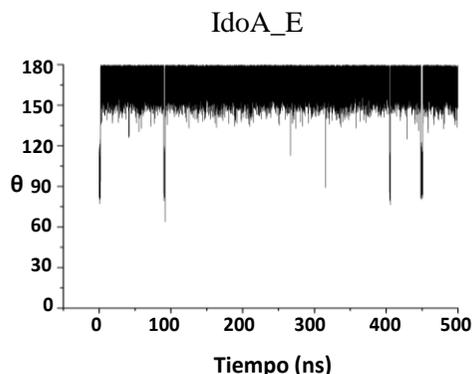
Para obtener datos cuantitativos acerca del equilibrio que presentan los anillos de Iduronato se han medido las constantes de acoplamiento a partir de experimentos 1D-COSY mediante la selección de los hidrógenos anoméricos y los que se encuentran en posición 5 de dichos anillos (**tabla 3.3.1.1**) debido a que se produce un gran solapamiento de señales. El grupo sulfato presente en el anillo del extremo no reductor no produce ningún cambio apreciable en el equilibrio conformacional, tal y como reflejan las constantes de acoplamiento ya que se observan valores muy parecidos entre los dos anillos de IdoA intermedios (C y E).

Pareja de átomos	$^3J_{HH}$ IdoA_A	$^3J_{HH}$ IdoA_C	$^3J_{HH}$ IdoA_E
H1/H2	4.4	3.3	3.4
H2/H3	7.6	6.2	6.3
H3/H4	4.5	3.7	3.8
H4/H5	3.1	3.0	2.9

**Tabla 3.3.1.1** Constantes de acoplamiento experimentales medidas a 298K para los 3 anillos de IdoA presentes en el hexasacárido.

Debido a que el análisis llevado a cabo mediante RMN reveló un equilibrio conformacional para los anillos de IdoA, este equilibrio se quiso contrastar con datos teóricos obtenidos de una simulación de dinámica molecular de 500 ns. Primero, de los resultados de la simulación obtenidos, se analizaron las coordenadas de plegamiento ( $\theta$  y  $\phi$ ) para los 3 anillos de IdoA que mostraban el equilibrio conformacional (**figura 3.3.1.3**). En este caso se observa como para los diferentes anillos la conformación predominante es  $^1C_4$  algo que en principio parece contrario a lo expuesto anteriormente. Se debe destacar que la conformación de los anillos de IdoA con la que fue lanzada la DM fue  $^2S_0$  para favorecer esa especie en el equilibrio. Anteriormente se lanzó otra DM desde una conformación  $^4C_1$  con resultado similar.





**Figura 3.3.1.3** Representación de la coordenada  $\theta$  para los tres anillos de IdoA presentes en el Hexasacárido 4S obtenidos de la DM libre a 500 ns.

De la simulación de la DM se midieron las constantes de acoplamiento teóricas. Como se obtuvo un equilibrio se midieron dos constantes, una para una conformación de silla y de bote torcido. Para medir la constante de acoplamiento de la coordenada del ecuador sólo se tuvieron en cuenta los valores de  $\phi$   $150^\circ$  ya que se calcularon todas las conformaciones que aparecen en la dinámica y son insignificativas comparadas con  ${}^2S_O$  (**tabla 3.3.1.2**).

Conformación	${}^3S_1$	$B_{1,4}$	${}^5S_1$	${}^{2,5}B$	${}^2S_O$	$B_{3,O}$
$\phi$	30	60	90	120	150	180
IdoA_A	3	1	1	4	84	6
IdoA_C	3	2	1	9	80	4
IdoA_E	0	1	1	8	86	3

**Tabla 3.3.1.2** Tabla representativa de los porcentajes de las conformaciones del ecuador de la esfera de Cremer-Pople para el Hexasacárido 4S.

Cuando la conformación preferida para los anillos es  ${}^1C_4$  las constantes de acoplamiento son muy pequeñas mientras que si es  ${}^2S_O$  son diferentes predominando valores intermedios y grandes. Si comparamos las  ${}^3J_{HH}$  experimentales (**tabla 3.3.1.3**) y teóricas para las dos conformaciones obtenidas de la dinámica libre se observa que las experimentales muestran valores situados entre las dos conformaciones, volviendo a reflejar un equilibrio.

Pareja de átomos	${}^3J_{HH}$ dinámica libre	${}^3J_{HH}$ dinámica libre
	${}^1C_4$	${}^2S_O$
H1A/H2A	1.9	5.7
H2A/H3A	1.8	9.6

H3A/H4A	2.4	5.2
H4A/H5A	1.3	3.7
H1C/H2C	1.8	5.1
H2C/H3C	2.2	10.1
H3C/H4C	2.5	6.4
H4C/H5C	1.5	4.1
H1E/H2E	1.7	5.3
H2E/H3E	2.9	9.9
H3E/H4E	2.8	4.2
H4E/H5E	1.3	4.0

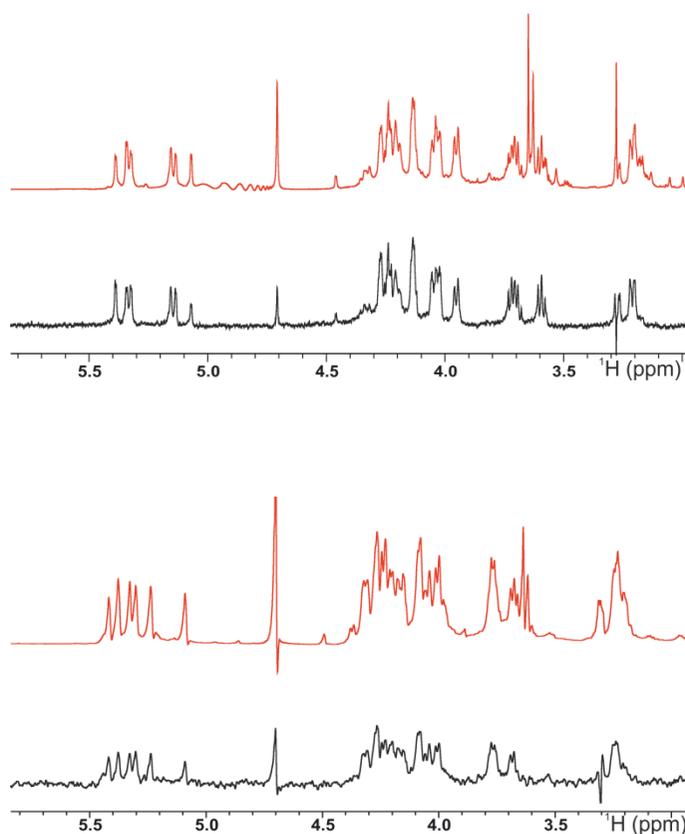
**Tabla 3.3.1.3** Constantes de acoplamiento teóricas medidas para las dos conformaciones del equilibrio que aparecen en la DM libre para el Hexasacárido 4S.

Se determinó el porcentaje para cada una de las conformaciones de los anillos de IdoA del hexasacárido en estado libre a partir de las constantes de acoplamiento. Para ello se llevó a cabo un ajuste lineal entre los valores de  ${}^3J_{\text{HH}}$  experimentales y teóricos obteniendo así un 75% de  ${}^2S_{\text{O}}$  y 26 de  ${}^1C_4$  para el anillo IdoA\_A, 45 de  ${}^2S_{\text{O}}$  y 55 de  ${}^1C_4$  para el IdoA\_C y, por último, un 55% de  ${}^2S_{\text{O}}$  y 45 de  ${}^1C_4$  para el IdoA\_E. Esto indica un mayor porcentaje de  ${}^2S_{\text{O}}$  para el anillo A mientras que el B y C muestran un equilibrio prácticamente del 50% en ambas conformaciones lo que no indica que se produzca algún efecto por el grupo  $\text{SO}^{3-}$  del anillo vecino.

### 3.3.2 Estudio estructural del hexasacárido asociado a Langerina.

Después de este análisis del ligando libre se pasó al estudio del complejo determinando la influencia del grupo sulfato en la interacción proteína-ligando. Como se ha mencionado en la introducción los trisacáridos que han sido tema de estudio con el FGF-1 también se utilizaron para determinar su interacción con la Langerina anteriormente en el grupo. De este estudio se obtuvo como resultado principal que los trisacáridos se coordinaban con el ión  $\text{Ca}^{2+}$  para su interacción con esta proteína. Para ello, utilizaban los grupos hidroxilos posicionados en 3 y 4 del anillo final del extremo no reductor. En este caso, el hexasacárido 4S presenta un grupo sulfato en la posición 4 lo que puede influir en la interacción por el  $\text{Ca}^{2+}$  situándose en una grieta cargada positivamente que se genera entre las 3 cadenas que constituyen el trímero de la Langerina.

El primer paso para estudiar dicha interacción fue la realización de experimentos de STD a diferentes tiempos de saturación para muestras que contenían  $\text{Ca}^{2+}$  y otras que no. Para ello se prepararon dos muestras: Una muestra fue preparada en 200  $\mu\text{L}$  del mismo buffer tris que el ligando libre, 1 mM de ligando y 17  $\mu\text{M}$  de Langerina, para la otra muestra se usó el mismo volumen de buffer tris pero con una concentración de 1,1 mM de ligando, 54  $\mu\text{M}$  de proteína y 10 mM de una disolución de EDTA para secuestrar el  $\text{Ca}^{2+}$ . Los espectros obtenidos a 4 s de saturación para ambas muestras son representados en la **figura 3.3.2.1**. Los espectros superiores fueron obtenidos para la muestra sin  $\text{Ca}^{2+}$  y los inferiores con  $\text{Ca}^{2+}$ . Los espectros rojos son espectros de referencia  $^1\text{H}$ -RMN y los negros son los espectros de diferencia  $^1\text{H}$ -STD. Estos últimos indican que se produce interacción entre la proteína y el ligando en ambos caso, con y sin  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, el hexasacárido 4S recibe saturación de la proteína de forma independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  ya que de forma *cualitativa* no se observa ningún protón al cual no le llegue saturación de la proteína. Esto es totalmente contradictorio a lo que se obtuvo para el complejo trisacárido-Langerina que mostraba una dependencia completa de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .



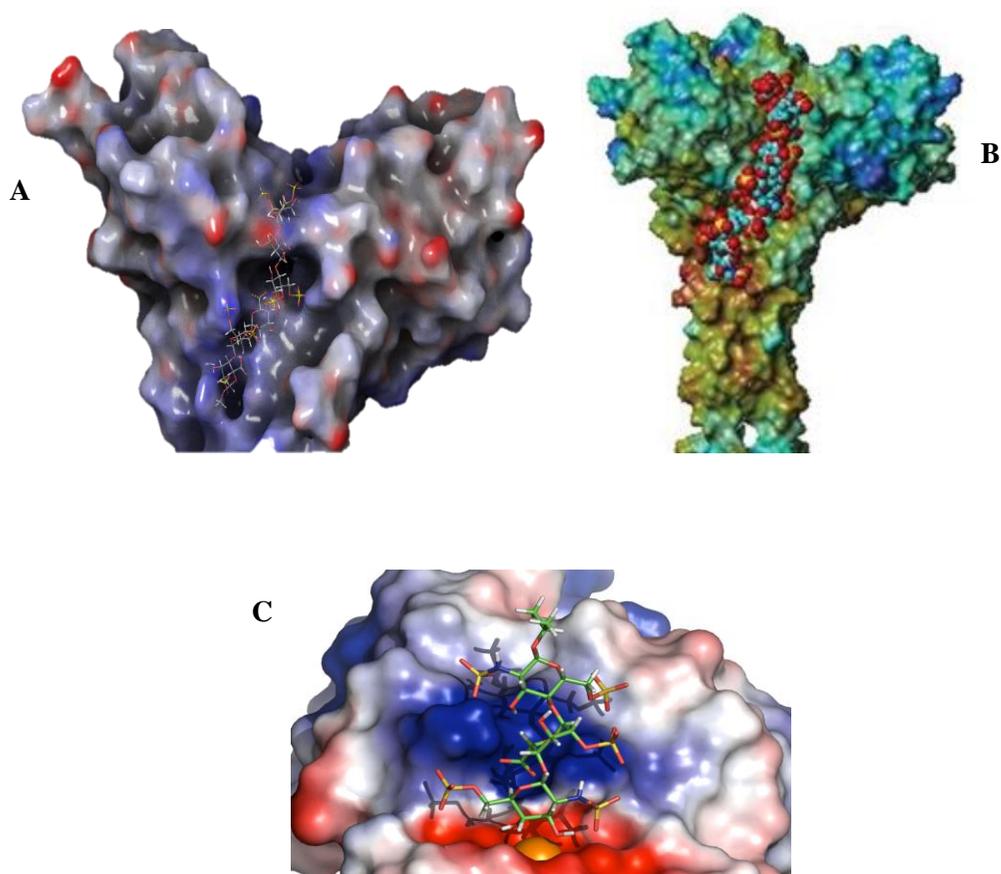
**Figura 3.3.2.1** Espectros monodimensionales de los experimentos de STD obtenidos a 4 s de saturación para una muestra que contiene  $\text{Ca}^{2+}$  (espectro superior) y sin  $\text{Ca}^{2+}$  y, por tanto, con EDTA (espectro inferior). El rojo es el espectro de referencia ( $^1\text{H}$ -RMN) y el negro de diferencia ( $^1\text{H}$ -STD). La temperatura de medida fue 298K para el Hexasacárido 4S.

Se midieron los valores de  $\text{STD}_0$  relativos para los protones anoméricos ya que son los que más aislados se encuentran en el espectro y se pudieron medir con más facilidad. Estos valores han sido obtenidos para la muestra que contenía  $\text{Ca}^{2+}$  hasta 5.0 s de saturación (**tabla 3.3.2.1**). Estos valores varían entre un rango de 46 a 100% sin mostrar ninguna tendencia a lo largo del hexasacárido. Esto claramente indica la orientación del hexasacárido en la grieta formada por el trímero de la Langerina.

	$\text{STD}_0$ relativo (%)		$\text{STD}_0$ relativo (%)
H1A	49	H1D	46
H1B	97	H1E	60
H1C	79	H1F	100

**Tabla 3.3.2.1** Valores de  $\text{STD}_0$  relativo medidos para cada uno de los protones anoméricos presentes en el Hexasacárido 4S a 298K.

Se quiso obtener una estructura del complejo formado por ambas especies por lo que se realizó un docking flexible y simple (SP) para el complejo. El resultado obtenido (**figura 3.3.2.2 A**) es muy similar el presentado en años anteriores (2012) por E. Chabrol (**figura 3.3.2.2 B**) mostrando que el ligando se une a la Langerina de forma independiente al  $\text{Ca}^{2+}$  interaccionando mediante fuerzas electrostáticas con los grupos cargados positivamente de la superficie de la proteína. Esta idea es totalmente contraria a los resultados obtenidos anteriormente para los trisacáridos derivados de Hp y la misma proteína los cuáles se coordinaban por el ión  $\text{Ca}^{2+}$  y se estabilizaba mediante interacciones electrostáticas con residuos vecinos de Lisina (**figura 3.3.5 c**).



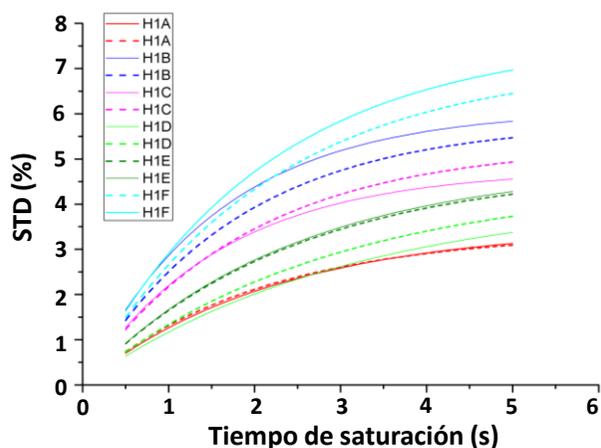
**Figura 3.3.2.2** Representación de los diferentes complejos formados por la Langerina y GAGs derivados de Hp. a) Muestra la estructura del complejo Langerina:Hexasacárido obtenida mediante docking. b) Muestra la misma proteína con un dodecasacárido publicada por E. Chabrol (2012). c) Representación del complejo formado por un trisacárido de Hp y la Langerina estudiado por J. C. Muñoz.

La última parte de este estudio fue la obtención de valores de  $STD_0$  relativos y teóricos para el complejo obtenidos a partir de CORCEMA-ST. Los tiempos de saturación teóricos fueron de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 s. Los valores de  $STD_0$  relativos teóricos son bastante similares a los obtenidos de forma experimental obtenidos mediante RMN (**tabla 3.3.2.2**).

	$STD_0$ relativo (%)		$STD_0$ relativo (%)
H1A	43	H1D	40
H1B	99	H1E	55
H1C	79	H1F	100

**Tabla 3.3.2.2** Valores teóricos del  $STD_0$  para cada protón anomérico del Hexasacárido medidos a partir de CORCEMA-ST a diferentes tiempos de saturación.

Además, las curvas de crecimiento del STD tanto experimental como teórico para cada uno de los anillos representan una gran similitud (**figura 3.3.2.3**) indicando que la estructura del complejo propuesta anteriormente y obtenida por docking puede ser bastante real. Se calculó también el factor R-NOE que indica la compatibilidad entre varios valores. Este es de 0.1 lo que indica una fiabilidad alta para ambos datos, experimentales y teóricos.



Líneas discontinuas → Valores experimentales. Líneas continuas → Valores teóricos.

**Figura 3.3.2.3** Curvas de crecimiento experimentales y teóricas del STD obtenidas para los protones anoméricos del Hexasacárido 4S mediante RMN y CORCEMA-ST.

### 3.4 CONCLUSIONES.

1. Los experimentos NOESY transferido a 15°C llevados a cabo para los trisacáridos **1** y **4** con el FGF-1 muestran que no se produce ningún cambio en la estructura de los trisacáridos al formar parte del complejo proteína-ligando. Esta estructura es similar a la estructura helicoidal de la heparina natural mostrando una conformación lineal.
2. Los estudios de STD llevados a cabo con todos los trisacáridos muestran que se produce interacción entre el FGF-1 y todos los trisacáridos de Hp. A partir de las curvas de crecimiento del STD medido para los protones anoméricos de los trisacáridos, se ha obtenido valores de  $STD_0$  muy pequeños, menos del 1%. Este porcentaje tan bajo puede deberse a la distancia tan larga que existe entre las cadenas laterales cargadas

positivamente del FGF-1 y los grupos sulfato negativos de los carbohidratos lo que provoca que los hidrógenos de los carbohidratos reciban poca saturación desde la proteína. Esto se pone de manifiesto en las estructuras de docking obtenidas para los complejos formados por los trisacárido **3** y **4**. Además, estos valores tan pequeños indican una gran diferencia de afinidad con respecto a otros GAGs más largos estudiados con el FGF-1 indicando la importancia de la longitud del GAGs en la afinidad y en la selectividad necesaria para la regulación biológica del FGF-1.

A pesar de eso, los valores de STD obtenidos para los trisacáridos del **1** al **4** muestran una interacción compatible con la zona principal del FGF-1 con tres grupos sulfatos orientados a la superficie de la proteína. Esto sólo se ha podido comprobar para los trisacáridos **3** y **4** mediante las estructuras de docking y los valores teóricos de STD de todos los trisacáridos de la serie 1. Los trisacáridos **1** y **2** al presentar un grupo sulfato más en el anillo de GlcN del extremo aparecen más estructuras del ligando cuando forma parte del complejo. Una de las estructuras encontradas es la obtenida mediante datos cristalográficos (2AXM) en la cual ese grupo sulfato es importante para la formación del dímero FGF-1:trisacárido. Esto podría estar de acuerdo con que las curvas de  $STD_0$  son mayores para los trisacáridos **1** y **2** que para los **3** y **4** indicando la importancia de ese grupo sulfato.

Los trisacáridos de la serie 2 no presentan ningún grupo sulfato en posición 2 del anillo de GlcN\_A. Este grupo es muy importante para la interacción tal y como se muestra en las constantes de disociación y en los valores de STD experimentales excepto para el trisacárido **7** y **8**. Como reflejan las curvas de crecimiento de STD, las del trisacárido **7** son muy parecidas a su equivalente de la serie 1, el trisacárido **3** y para el **8** son incluso mayores que para su equivalente, el **4**, aunque las constantes de disociación para ellos sean mayores que para los trisacáridos **3** y **4**. Esto puede estar de acuerdo con los resultados de docking con un grid grande ya que se observa que los dos trisacáridos (**7** y **8**) se unen a una zona adicional de la proteína además de a la zona secundaria y primaria. Lo cual justifica que los valores de  $STD_0$  no sean menores ya que se unen en otra zona en la que le puede llegar más saturación desde la proteína y que los valores de constante de disociación sean mayores ya que se unen en otra zona que no está tan cargada positivamente con la zona principal lo que provoca una menor interacción. Debido a las diferentes zonas encontradas y estructuras no se ha podido obtener valores de  $STD_0$  teóricos aceptables para determinar la formación del complejo.

3. En el caso de la interacción entre el Hexasacárido y Langerina se ha comprobado su existencia y demostrado que esta se produce por la grieta que se forma en las

intersecciones de los dominios que forman el cuello de las tres regiones extracelulares. La estructura propuesta en esta interfase se ha demostrado por simulación de los resultados de STD basados en la geometría del complejo.

### 3.5 PARTE EXPERIMENTAL

#### **Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.**

Los experimentos de RMN para el estudio de los trisacáridos se realizaron en un BRUKER 600 MHz AVANCE III HD con un imán ASCEND III equipado con una criosonda QCI S3 H/F-C/N-D 05-Z. Para el estudio del Hexasacárido se utilizó el espectrómetro de 700 MHz, Bruker AVANCE III, situado en el servicio técnico del CITIUS (Sevilla).

Los trisacáridos y el hexasacárido de Hp fueron sintetizados previamente en el grupo. El FGF-1 humano comercial se compró a Peprotech el cual consistía en 141 residuos expresado en *E. coli* con una masa molecular de 16.5 KDa. La Langerina fue proporcionada por el laboratorio de Franck Fieschi.

La determinación de la estructura tridimensional de los trisacáridos fue realizada por Juan Carlos Muñoz en su tesis doctoral. Para el traslado de la asignación previa a la actual ya que se han cambiado las condiciones, se han realizado experimentos selectivos sobre los anoméricos, HSQC y COSY-dqf a 298 K. Los experimentos realizados para la determinación estructural del Hexasacárido 4S fueron un 2D-TOCSY y un 2D-NOESY.

Tras una optimización de las condiciones después de varios experimentos negativos, se logró encontrar condiciones adecuadas. Las muestras para llevar a cabo los experimentos de STD<sup>17,18</sup> y NOESY<sup>19</sup> transferido fueron preparadas en 250 µL con una concentración de buffer fosfato de 5mM a pH 6.0 y 100 mM de NaCl en 99.39% de D2O. La relación final proteína-ligando usada fue de 1:84, con una concentración de FGF-1 19µM y de ligando 1.6mM.

---

<sup>17</sup> M. Mayer, B. Meyer, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, 38, 1784.

<sup>18</sup> J. Angulo, P.M. Nieto, *European Biophysics Journal* **2011**, 40, 1357.

<sup>19</sup> F. Ni, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1994**, 26, 517.

En las tablas siguientes se resumen las pruebas realizadas para optimizar la relación proteína ligando la concentración del tampón fosfato. Las concentraciones para las diferentes muestras preparadas para el trisacárido **4** fueron:

PRUEBAS	PROTEÍNA ( $\mu\text{M}$ )	LIGANDO	RELACIÓN	BUFFER FOSFATO (mM)	NaCl (mM)
1	19	100 $\mu\text{M}$	1:5	10	150
2	19	200 $\mu\text{M}$	1:10	10	150
3	19	200 $\mu\text{M}$	1:10	10	100
4	19	617 $\mu\text{M}$	1:33	10	100
5	19	1.6 mM	1:84	5	100

Las concentraciones en las muestras preparadas para el trisacárido **1** fueron:

PRUEBAS	PROTEÍNA ( $\mu\text{M}$ )	LIGANDO	RELACIÓN	BUFFER FOSFATO (mM)	NaCl (mM)
1	19	100 $\mu\text{M}$	1:5	5	100
2	19	200 $\mu\text{M}$	1:10	5	100
3	19	500 $\mu\text{M}$	1:26	5	100
4	19	1.6 mM	1:84	5	100

Los experimentos de STD son esencialmente los descritos por Meyer con las mejoras recogidas en la bibliografía: previa purga antes de iniciar el experimento se irradia selectivamente durante el tiempo de relajación con un tren de pulsos gaussianos de 49 ms y un ancho de banda de 80 Hz aproximadamente correspondiente a una atenuación de 60 dB separados por un intervalo de 1 ms; posteriormente se introdujo un filtro *spin-lock* para disminución de las señales residuales de la proteína y finalmente se suprimió el agua residual con *excitation sculpting*. La frecuencia de irradiación utilizada para obtener el espectro on-resonance fue de 7 ppm (irradiando la zona aromática de la proteína) y off-resonance de 40 ppm. Los tiempos de saturación para la obtención de las curvas de STD fueron de 0.5, 1, 2, 3 y 4 s variando el tiempo de relajación inversamente al tiempo de relajación de cada experimento con un mínimo de 0.1s. Así se mantiene constante el tiempo total del experimento. Para estos experimentos se hicieron con 2048 escanes de 2 fides de 16384 puntos de adquisición y un tiempo total para cada tiempo de saturación de 5h.

A partir de los datos de STD (%) variando el tiempo de saturación se obtiene la curva de crecimiento del STD. De tal curva se obtiene los valores de  $STD_0$  obtenidos de los valores de las pendientes iniciales ajustando la curva a una ecuación monoexponencial de crecimiento asintótico:

$$STD_0(t_{sat}) = STD_{max} \cdot (1 - \exp(-k_{sat} \cdot t_{sat})) \quad \text{Ecuación 1}$$

$STD_{max}$  es el máximo asintótico de la curva y  $k_{sat}$  es una constante que depende de las propiedades de relajación de cada protón. Por último,  $t_{sat}$  es el tiempo de saturación.

Los experimentos del  $T_1$  selectivo mediante RMN<sup>20,21</sup> se llevaron a cabo con una concentración de proteína de 19  $\mu\text{M}$  y las concentraciones de ligando fueron variando (80, 160, 320, 480 y 640  $\mu\text{M}$ ) obteniendo así una relación proteína-ligando de 1:4, 1:8, 1:16, 1:24 y 1:32 respectivamente. La concentración de los trisacáridos en su forma libre fue de 500  $\mu\text{M}$ . Los tiempos de relajación,  $T_1$ , se midieron empleando la técnica de inversión recovery (incluyendo un pulso de 180° selectivo, Gaussiano, y un pulso de 90° duro). Para cada una de las relaciones se hicieron 10 experimentos variando el tiempo de relajación: 1, 50, 100, 200, 400, 800, 1, 2, 5, 8 y 10 s.

Para obtener el  $T_1$  selectivo se usó el módulo de Dynamic Center de TopSpin. De aquí se obtuvieron los  $T_1$  selectivos ( $\text{s}^{-1}$ ). Para calcular los valores de  $K_D$  se utiliza la siguiente ecuación:

$$[P_0] \cdot T_{1obs} = ([L_0] + K_D) (T_{1enlazado} + \sigma_{enlazado}) \quad \text{Ecuación 2}$$

Se representa  $[P_0] \cdot T_{1obs}$  vs  $[L_0]$ . De ahí se obtiene una pendiente que es  $(T_{1enl} + \sigma_{enl})$  y de la ordenada en el origen se obtiene la  $K_D$ .

---

<sup>20</sup> L. Fielding, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2007**, 51, 219.

<sup>21</sup> Y. Fraenkel, G. Navon, A. Aronheim, J.M. Gershoni, *Biochemistry* **1990**, 29, 2617.

## Docking

Para llevar a cabo el docking se usó el módulo de Glide implementado en Schrödinger.<sup>22</sup> Además, se utilizó la estructura de la proteína con código 2ERM obtenida por RMN. A partir del hexasacárido presente en esta estructura se obtuvieron los diferentes trisacáridos y estas estructuras se superpusieron sobre el hexasacárido de partida. Antes de llevar a cabo el docking se realizó una búsqueda conformacional de todos los ligando manteniendo la conformación de los anillos. Después se construyó un grid centrado en la parte principal de la proteína FGF-1 de 16 Å y se llevó a cabo el docking con las estructuras obtenidas de la búsqueda conformacional.

## CORCEMA-ST

Por último, después de la obtención de diferentes estructuras del docking se hizo una simulación teórica del STD mediante cálculos de la matriz de relajación completa según se implementada en el programa CORCEMA-ST codificado en MATLAB.<sup>23,24</sup> Se usaron las mismas coordenadas para la proteína y para el complejo que las obtenidas del pdb. Las condiciones usadas para CORCEMA-ST fueron las mismas que las usadas para la obtención de los STD experimentales. Así, la concentración de los trisacáridos fue de 1.5 mM, el tiempo de correlación de la proteína fue de 22 ns y del ligando de 0.4 ns. Se utilizó una distancia umbral de corte de 8 Å alrededor del ligando, de forma que sólo aquellos residuos con una distancia por debajo de esta, fueron incorporados en los cálculos. La selección de los protones de la proteína instantáneamente saturados fue realizada por el programa basándose en una tabla de los desplazamientos químicos predichos para el FGF-1 realizada por el programa SHIFTX.<sup>25</sup> Se asumió una cinética de asociación controlada por una constante de equilibrio de 500000 M<sup>-1</sup> asignando un valor de 0.85 para el parámetro de S<sub>2</sub> de los metilos de la proteína. El tiempo de correlación

---

<sup>22</sup> Schrodinger Release 2015-4: Maestro 10.4, Schrodinger, LLC: New York, NY, USA, 2015.

<sup>23</sup> Y. Yuan, D.W. Bleile, X. Wen, D.A.R. Sanders, K. Itoh, H.W. Liu, B.M. Pinto, *Journal American Chemistry Sociaty* **2008**, *130*, 3157.

<sup>24</sup> N. Rama Krishna, V. Jayalakshmi, *Progress Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2006**, *49*, 1.

<sup>25</sup> S. Neal, A.M. Nip, H. Zhang, D.S. Wishart, *Journal Biomolecular NMR*, **2003**, *26*, 215.

del ligando libre usado fue de 0.9 ns. Para simular la relajación no-específica por el oxígeno paramagnético presente en la disolución, utilizamos unos valores de pérdidas de 0.1 a 0.3 s<sup>-1</sup> para todos los protones en estado libre y enlazado.

## **CAPÍTULO 4**

### **Interacción de Midkina con GAGs**

#### 4.1 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

Como ya se mencionó en la introducción (capítulo 1) la Midkina es un factor de crecimiento el cuál interacciona con diferentes GAGs para llevar a cabo sus funciones biológicas. Estos GAGs son del tipo Hp o CS e interaccionan en el rango nM.<sup>1</sup> La Midkina interviene en numerosos procesos biológicos promoviendo el desarrollo, la migración y la supervivencia de varios tipos de células.<sup>2,3</sup> Además, este factor de crecimiento puede unirse a diferentes inhibidores<sup>4</sup> siendo útil en el tratamiento de tumores malignos y en la esclerosis múltiple ya que una alta expresión de esta proteína es observada en células cancerígenas. La unión proteína-ligando (Midkina-GAGs) es una unión específica ya que se produce mayoritariamente con CS tipo E y Heparina los cuales poseen dos grupos sulfato en el anillo de GlcNAc siendo ellos probablemente necesarios para que se produzca tal interacción. Por lo tanto, se justifica la formación y estabilidad del complejo mediante interacciones electrostáticas entre los GAGs polianiónicos y los grupos cargados positivamente de la Midkina.<sup>5,6,7</sup>

Uno de los objetivos de nuestro grupo de investigación al comienzo de este tema fue el estudio de la interacción de tetrasacáridos sintéticos derivados de CS con la Midkina. Para ello se sintetizaron tetrasacáridos con diferente secuencia (CS y mixtos DS/CS, conteniendo iduronatos) además de aumentar la sulfatación del CS tipo E obteniendo el tipo T. Así se podían conocer las bases moleculares de dichas interacciones y encontrar diferencias entre la interacción con tetrasacáridos de diferente secuencia y patrón de sustitución. Antes de comenzar con el estudio de la interacción de dos tetrasacáridos con la Midkina se llevó a cabo el estudio de 4 tetrasacáridos en su forma libre determinando

---

<sup>1</sup> S. S. Deepa, Y. Umehara, S. Higashiyama, N. Itoh, K. Sugahara, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 43707.

<sup>2</sup> T. Muramatsu, *Current Pharmaceutical Design* **2011**, 17, 410.

<sup>3</sup> K. Kadomatsu, S. Kishida, S. Tsubota, *Journal of Biochemistry* **2013**, 153, 511.

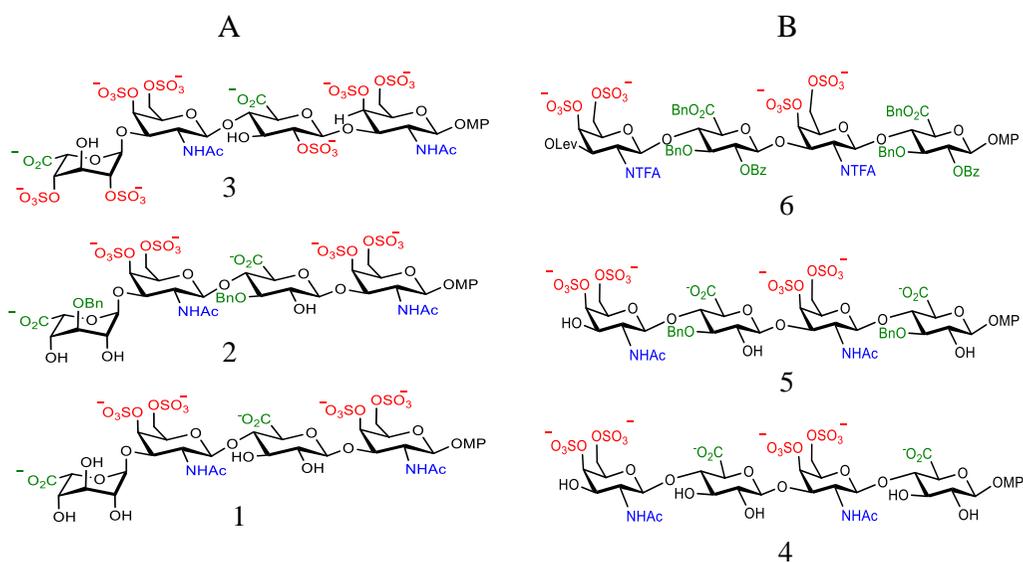
<sup>4</sup> T. Matsui, K. Ichihara-Tanaka, C. Lan, H. Muramatsu, T. Kondou, C. Hirose, S. Sakuma, T. Muramatsu *Internacional Archives of Medicine* **2010**, 3, 12.

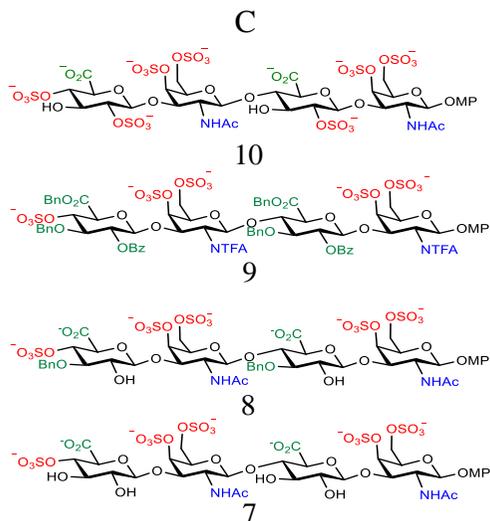
<sup>5</sup> C. I. Gama, S. E. Tully, N. Sotogaku, P. M. Clark, M. Rawat, N. Vaidehi, W. A. Goddard, A. Nishi, L. C. Hsieh-Wilson, *Nature Chemistry Biology* **2006**, 2, 467.

<sup>6</sup> C. J. Rogers, P. M. Clark, S. E. Tully, R. Abrol, K. C. Garcia, W. A. Goddard III, L. Hsieh-Wilson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, 9747.

<sup>7</sup> H. Kawashima, K. Atarashi, M. Hirose, J. Hirose, S. Yamada, K. Sugahara, M. Miyasaka, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 12921.

sus estructuras tridimensionales y sus flexibilidades conformacionales. La **figura 4.1.1** representa todos los tetrasacáridos estudiados en el grupo, los estudiados anteriormente y durante esta tesis doctoral. En dicha figura podemos observar tres series (A, B y C) las cuáles presentan diferente secuencia. Así la serie A contiene tetrasacáridos híbridos CS/DS, la B contiene tetrasacáridos compuestos por una secuencia de CS alternada y la serie C contiene dos disacáridos con secuencia CS normal. Con alternada se hace referencia al cambio en la posición de los anillos de GlcNAc y GlcA. La serie A contiene tres tetrasacáridos los cuáles varían en el patrón de sulfatación y en la presencia de grupos protectores aromáticos. Así, se denomina al tetrasacárido **1** desprotegido (con patrón de sulfatación tipo E), al **2** dibencilado (con el mismo patrón de sulfatación que el anterior) y al **3** desprotegido (con un patrón de sulfatación tipo T más un grupo sulfato adicional en el extremo no reductor). La serie B también está formada por 3 tetrasacáridos. El compuesto **4** desprotegido, el **5** dibencilado y el **6** persustituido presentando todos unos patrones de sustitución tipo E con dos grupos sulfato en los anillos de GalNAc. Y por último la serie C que presenta 4 tetrasacáridos diferentes pero con la misma secuencia. El tetrasacárido **7** está desprotegido, el **8** dibencilado, el **9** persustituido y el **10** desprotegido pero con un patrón de sulfatación tipo T más un sulfato en el extremo no reductor.





**Figura 4.1.1** Representación de 10 tetrasacáridos divididos en 3 series en función de la secuencia: A para secuencia híbrida CS/DS, B para el patrón CS normal y C para un patrón CS con secuencia alternada respecto a la serie B. Dentro de cada serie los tetrasacáridos se diferencian en el patrón y grado de sulfatación y sustitución. Así la serie A presenta 3 tetrasacáridos, el **1** es un ligando no protegido con patrón de sulfatación CS tipo E, el **2** con el mismo patrón pero con dos grupos bencilos y el **3** presenta un patrón de sulfatación tipo T más un grupo sulfato en el extremo no reductor. La serie B contiene el tetrasacárido **4** no protegido y patrón de sulfatación E, el **5** con un patrón de sulfatación tipo E y dos grupos bencilos y el **6** que está persustituido. Por último, la serie C la componen 4 tetrasacáridos, el **7** sin proteger con patrón de sulfatación tipo E, el **8** muestra el mismo patrón de sulfatación aunque dibencilado, el **9** persustituido y el **10** con un patrón de sulfatación tipo T. Todos los oligosacáridos de esta última serie muestran un grupo sulfato adicional en el extremo no reductor.

Como antecedentes de este tema se debe de mencionar de los 10 tetrasacáridos mostrados en la **figura 4.1.1**, los tetrasacáridos **1**, **3**, **4**, y **10** que se estudiaron previamente en el grupo de investigación en su forma libre y de ellos el **3** y **4** (los dos desprotegidos pero con diferente secuencia y patrón de sulfatación) se analizaron en su forma complejada con la Midkina. De este estudio realizado se van a explicar de forma resumida los resultados obtenidos. La determinación estructural de los 4 tetrasacáridos mediante los ángulos de torsión, distancias experimentales y dinámicas moleculares sin y con restricciones promediadas en el tiempo mostraron una estructura extendida de los tetrasacáridos con uniones glicosídicas ( $\text{syn-}\Psi$ ) y conformaciones canónicas de  ${}^4C_1$  para todos los anillos excepto para los de IdoA. Los anillos de GlcNAc y GlcA mostraban una conformación  ${}^4C_1$  independiente del grado de sulfatación. Sin embargo, el anillo de IdoA varía su conformación en presencia o no de grupos sulfato. Es bien conocido el equilibrio conformacional de este anillo cuando se encuentra en posiciones internas en

compuestos con estructura de Heparina ( ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$ ).<sup>8,9</sup> En este caso, el anillo de IdoA más sulfatado muestra una conformación  ${}^1C_4$  mayoritaria mientras que el mismo anillo sin sulfatar presenta un equilibrio conformacional entre las conformaciones  ${}^4C_1$ ,  ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$  aumentando así la flexibilidad anular.<sup>10</sup> Además del estudio conformacional de los ligandos en su forma libre también se analizaron las estructuras de los complejos formados con la Midkina mediante experimentos de NOESY transferido, STD y docking realizados con las mismas condiciones de concentración proteína-ligando, 20  $\mu$ M y 1 mM respectivamente para los dos complejos formados por los tetrasacáridos **3** y **4**. Como ya se ha mencionado con estos dos tetrasacáridos se pretendía obtener una noción de la influencia de la secuencia y/o del patrón de sulfatación en la unión entre los GAGs y la Midkina. Los experimentos NOESY transferidos mostraban una conformación extendida similar a la del ligando libre ya que mostraban los mismos picos NOEs (negativos) para las uniones glicosídicas. Por otro lado, el estudio mediante experimentos de STD de la asociación mostraba unos valores de STD absolutos para los tetrasacáridos **3** y **4** comprendidos ente un 0 y un 2% en ambos casos.<sup>10</sup> Se obtuvo el mapa del epítipo para ambos tetrasacáridos indicando un modo de unión con la Midkina en el cuál el ligando se encuentra rodeado por las dos cadenas de la proteína, lo que justica los valores del  $STD_0$  tan similares en todo el tetrasacárido sin poder indicar un modo de unión preferente o asimétrico no encontrando diferencias en el mapa del epítipo entre ambas estructuras.<sup>10</sup> Sin embargo, los espectros de  ${}^1H$ -RMN para cada uno de los dos tetrasacáridos mostraron que el tetrasacárido con más grupos sulfato, **3**, presenta un espectro con señales más anchas que el tetrasacárido **4** indicando una mayor interacción con la Midkina. Esto fue confirmado con los valores de  $IC_{50}$  obtenidos de los experimentos de PF (apartado 4.2.3). Estos valores indican que el tetrasacárido persulfatado presenta un porcentaje de inhibición mucho mayor, del orden de 8.0  $\mu$ M y el tetrasacárido **3** de 254  $\mu$ M. Se llevaron a cabo cálculos de docking con las mismas condiciones para los dos tetrasacáridos con el modelo 3 de la Midkina de código pdb 1MKN (estructura obtenida mediante RMN). Con este modelo se obtuvieron muchas estructuras en la zona de la proteína denominada hinge “bisagra” ya que es la de unión flexible entre los dos dominios de la proteína. Estas estructuras están de acuerdo con las

---

<sup>8</sup> J.C. Muñoz-García, J. López-Prados, J. Angulo, I. Diaz-Contreras, N. Reichard, J. L. de Paz, M. Martin-Lomas, P. M. Nieto, *Chemistry European Journal* **2012**, *18*, 16319.

<sup>9</sup> J. C. Muñoz-García, F. Corzana, J. L. de Paz, J. Angulo, P. M. Nieto, *Glycobiology* **2013**, *23*, 1220.

<sup>10</sup> C. Solera, G. Macchione, S. Maza, M. M. Kayser, F. Corzana, J. L. de Paz, P. M. Nieto, *Chemistry European Journal* **2016**, *22*, 2356.

múltiples orientaciones que pueden existir debido a los valores de  $STD_0$  tan difusos que se obtuvieron y, por lo tanto, no se pudo indicar una orientación mayoritaria.

Después de los antecedentes mencionados se decidió estudiar la estructura tridimensional de los compuestos dibencilados (**2**, **5**, **8**), persustituidos (**6** y **9**) y libre (**7**). Se pretendía valorar la existencia de cambios conformacionales en los anillos de GalNAc, IdoA o GlcA y o en la estructura tridimensional lineal respecto a la presentada por los tetrasacáridos sin bencilar debido a los efectos de sulfatación, bencilación y secuencia. Además, se pretendía determinar si algunos de estos cambios pudiesen afectar a la formación del complejo proteína-ligando siendo capaz de influir en la interacción. Incluso, podían aparecer fuerzas de interacción diferentes a las electrostáticas entre la proteína y el ligando debido a los grupos aromáticos protectores del ligando como interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking o CH- $\pi$ .<sup>11,12,13,14,15</sup> Por consiguiente se llevó a cabo el estudio de los complejos formados por todos los tetrasacáridos (**figura 4.1.1**) excepto los que ya estaban estudiados anteriormente por el grupo de investigación (**3** y **4**).

Otra serie de compuestos que se van a estudiar en esta tesis doctoral son los disacáridos **11-15** y pentasacárido **16** (**figura 4.1.2**). Dichos compuestos presentan dos secuencias diferentes y en todos ellos se ha reemplazado los anillos de Ácido Urónico (GlcA o IdoA) por residuos de Glucosa. En principio, los disacáridos del **11** al **14** serían miméticos de Heparina al reemplazar el ácido urónico por glucopiranososa aunque en este caso la unión glicosídica no se correspondería. Así, los compuestos **15** y **16** serían miméticos de CS al contener galactosamina. Por lo tanto, los disacáridos del **11** al **14** representan secuencias disacarídicas de Glc-GlcN las cuales se diferencian en el grado de sulfatación. La diferencia entre los compuestos **15** y **16** es la longitud presentando

---

<sup>11</sup> J. L. Asensio, A. Ardá, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46*, 946.

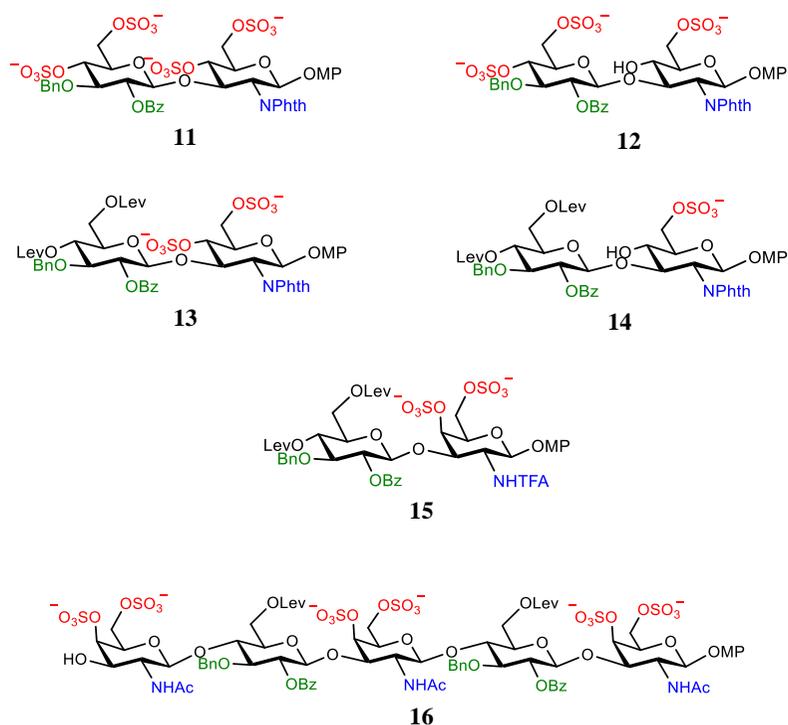
<sup>12</sup> S. Vandenbussche, D. Díaz, M. C. Fernández-Alonso, W. Pan, S. P. Vincent, G. Cuevas, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, K. Bartik, *Chemistry European Journal* **2008**, *14*, 7570.

<sup>13</sup> K. Ramírez-Gualito, R. Alonso-Ríos, B. Quiroz-García, A. Rojas-Aguilar, D. Díaz, J. Jiménez-Barbero, G. Cuevas, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 18129.

<sup>14</sup> M. I. Chávez, C. Andreu, P. Vidal, N. Aboitiz, F. Freire, P. Groves, J. L. Asensio, G. Asensio, M. Muraki, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Chemistry European Journal* **2005**, *11*, 7060.

<sup>15</sup> M. C. Fernández-Alonso, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, G. Cuevas, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7379.

ambos compuestos una secuencia Glc-GalN4,6S. Además, todos presentan grupos protectores aromáticos (benzoilo y bencilo) ya que se parte de la hipótesis de que los grupos aromáticos favorecen la interacción proteína-ligando.



**Figura 4.1.2** 3 disacáridos sintéticos miméticos de Heparina (**11**, **12** y **13**) y 2 compuestos sintéticos derivados de CS, el **14** (disacárido) y **15** (pentasacárido). Ambos con la misma secuencia y mismo patrón de sulfatación excepto el cambio de grupos Lev por Piv.

El estudio de todos los compuestos bien para los tetrasacáridos como para los disacáridos consistió en la determinación estructural de todos los compuestos libres y de los complejos que forman con la Mikdina. Tanto el análisis molecular como el estudio de las bases que rigen la interacción proteína-ligando se llevó a cabo mediante técnicas de RMN (NOESY transferido, NOESY, STD, S<sup>3</sup>-HMBC sólo para el tetrasacárido para el que fue necesario), simulaciones de dinámica molecular y docking. Debido a que los experimentos de conformación de los complejos deben de ser llevados a cabo en buffer para estabilizar la estructura de la proteína y eliminar cualquier diferencia con los experimentos realizados con los compuestos libres se prepararon las muestras del ligando libre en el mismo buffer y con la misma concentración que para el complejo.

## OBJETIVOS

1. Determinar la estructura tridimensional mediante espectroscopía de RMN y dinámica molecular del tetrasacárido **7** en su forma libre; **2, 5, 8** dibencilados; y **6 y 9** persustituidos.
2. Comprobar la influencia en el comportamiento conformacional de la secuencia, el patrón de sulfatación y el aumento de la sustitución por grupos protectores hidrofóbicos en los tetrasacáridos.
3. Estudiar las bases moleculares que rigen la interacción tetrasacáridos desprotegidos-Midkina mediante de NOESY transferido, STD y docking. Para ello se estudiaron los complejos formados por los tetrasacáridos desprotegidos **1** y **7** (CS tipo E) y el tetrasacárido **10** (CS tipo T). Con este estudio se pretende encontrar diferencias en el modo de unión según la secuencia y el grado de sulfatación ya que sólo con el estudio realizado anteriormente de los complejos formados con los tetrasacáridos **3** y **4** no era suficiente.
4. Determinar el modo de unión de los productos dibencilados (compuestos **2, 5** y **8**) y persustituidos (**6** y **9**) con la Midkina intentando encontrar diferencias en la estructura del complejo o en las fuerzas que rigen la interacción por la presencia de grupos protectores hidrofóbicos y su afinidad.
5. Conocer la estructura tridimensional de los disacáridos miméticos con diferente secuencia (**11, 12, 13, 14** y **15**) junto con el pentasacárido **16** de igual secuencia que el disacárido **15**.
6. Estudiar el complejo formado por los disacáridos y la Midkina de igual forma que con los tetrasacáridos. Determinar la interacción producida cuando se produce la pérdida de grupos sulfato y la influencia de la secuencia con los mismos grupos protectores (compuestos **13** y **15**). Valorar el papel de los ácidos urónicos en la interacción y comprobar la influencia de las cargas en la interacción (serie **11-14**) y el aumento de la longitud de la cadena.

### 4.2 ESTUDIO DE LOS TETRASACÁRIDOS LIBRES Y COMPLEJADOS.

Este apartado está dividido en tres partes. La primera consiste en el estudio de los tetrasacáridos dibencilados (**2, 5** y **8**), el desprotegido (**7**) y los persustituidos (**6** y **9**) en su forma libre mediante técnicas de espectroscopía de RMN y dinámica molecular. La segunda refleja el estudio de los complejos formados por los tetrasacáridos dibencilados (**2, 5** y **8**) y desprotegidos (**1, 7** y **10**) con la Midkina mediante técnicas de

espectroscopía de RMN y docking. Y la última parte son datos de inhibición de los complejos medidos por Polarización de Fluorescencia.

#### 4.2.1 Determinación estructural de los ligandos en su forma libre mediante RMN y dinámica molecular.

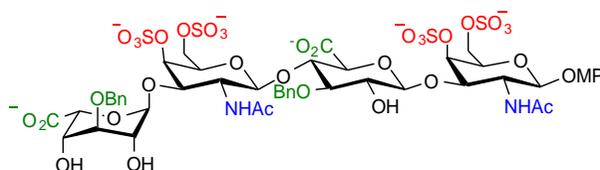
##### 4.2.1.1 *Tetrasacáridos dibencilados con tres secuencias diferentes (compuestos 2, 5 y 8) y un tetrasacárido desprotegido con secuencia CS (compuesto 7).*

Para el estudio de estos compuestos mediante RMN se prepararon muestras de todos ellos, con una concentración de 1 mM en 250  $\mu$ L de buffer 1x PBS (concentración del buffer) en D<sub>2</sub>O.

Para todos los compuestos se llevaron a cabo experimentos de asignación de RMN tales como <sup>1</sup>H-RMN, COSY, TOCSY, HSQC y NOESY a 700 MHz y a 600 MHz a 298K de forma general. Cuando fue conveniente se usaron experimentos sensibles a la fase, de sensibilidad incrementada, eco-antieco y con filtro de cero cuanto. Tales experimentos fueron acompañados de experimentos monodimensionales selectivos de los protones anoméricos a 600 MHz debido a su mejor rendimiento y sensibilidad. Tanto los espectros como las tablas con los desplazamientos químicos de cada uno de los tetrasacáridos se pueden encontrar en el material suplementario.

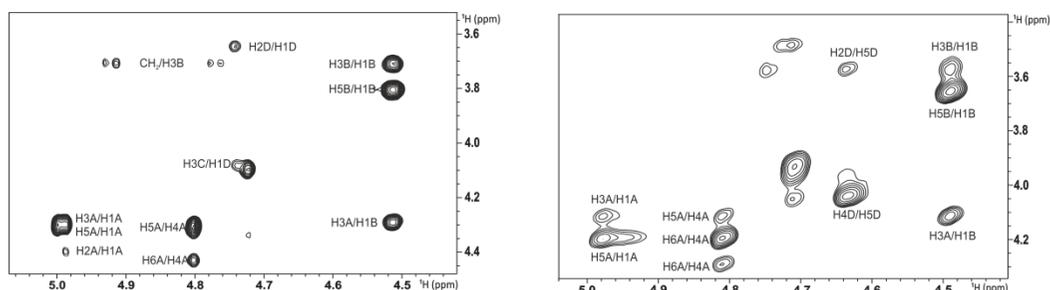
##### ➤ *Tetrasacárido 2.*

El tetrasacárido **2** presenta una secuencia híbrida CS/DS formada por IdoA-GalNAc-GlcA-GalNAc combinando en la misma molécula residuos de GlcA e IdoA recientemente propuestos como potenciales ligandos activos (**figura 4.2.1.1**)



**Figura 4.2.1.1** Estructura del tetrasacárido **2** que presenta una secuencia híbrida DS/CS con dos grupos bencilos en los anillos de IdoA y GlcA.

El anillo de IdoA en GAGs presenta un característico equilibrio conformacional que es dependiente de su propia sulfatación, la sustitución de los anillos adyacentes y de su posición dentro de la cadena (terminal o interno). Para los residuos internos de Heparina regular se encuentra un equilibrio de conformaciones mayoritarias  ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$ . Dicho equilibrio se detecta por la presencia de un NOE exclusivo de la conformación  ${}^2S_0$  y se analiza evaluando las constantes de acoplamiento intraanulares que aparecen como promedio de las correspondientes conformaciones participantes.<sup>9</sup> Para poder valorar si se produce un equilibrio conformacional para este anillo en una secuencia DS se realizaron experimentos NOESY para el tetrasacárido **2** a 700 MHz a diferentes temperaturas (**figura 4.2.1.2**). A baja temperatura se puede apreciar un pico NOE H2D/H5D indicativo de la presencia de la conformación  ${}^2S_0$  mientras que alta temperatura este se solapa con la señal del agua. Las conformaciones para los anillos A y B son  ${}^4C_1$  como era de esperar ya que se observan los picos NOEs característicos de esta conformación (H3/H1 y H5/H1) para ambos anillos.



**Figura 4.2.1.2** Espectros NOESY a 700 MHz. A la izquierda alta temperatura (281K) y el de la derecha alta temperatura del tetrasacárido **2**. Representación sólo de la parte anomérica para ambas temperaturas.

Las constantes de acoplamiento medidas son consistentes con una conformación  ${}^4C_1$  para los anillos A, B y C y  ${}^2S_0$  mayoritaria para el IdoA (**tabla 4.2.1.1**). Estas fueron medidas mediante un experimento  $S^3$ -HMBC a 310K.

Pareja de hidrógenos	${}^3J_{HH}$ experimental	Pareja de hidrógenos	${}^3J_{HH}$ experimental
H1A/H2A	8.5	H2C/H3C	7.8
H3A/H4A	3.5*	H3C/H4C	2.2
H2B/H3B	8.3*	H4C/H5C	1.2

H3B/H4B	8.7	H1D/H2D	5.6
H4B/H5B	10.4	H2D/H3D	9.9
		H3D/H4D	6.0

**Tabla 4.2.1.1** Valores de  $^3J_{\text{HH}}$  medidos para el tetrasacárido **2** a 298K a partir del experimento  $S^3$ -HMBC.

Las distancias experimentales también pueden predecir un posible equilibrio si lo hubiese para el IdoA (**tabla 4.2.1.2**). Para ello se llevaron a cabo experimentos NOESY a diferentes tiempos de mezcla y temperaturas obteniendo la curva del crecimiento del NOE para los hidrógenos interanulares. En este caso, se observa una distancia H2D/H5D corta indicando una conformación mayoritariamente  $^2S_0$ . Las distancias para los anillos A y B se han calculado a partir de la curva de crecimiento del NOE a 281K y las distancias para el anillo D se han medido con un NOESY a 298K. Además, a ninguna de las temperaturas hemos podido obtener la señal para el H1C aislada para poder medir las distancias aunque sí se han podido determinar los NOEs.

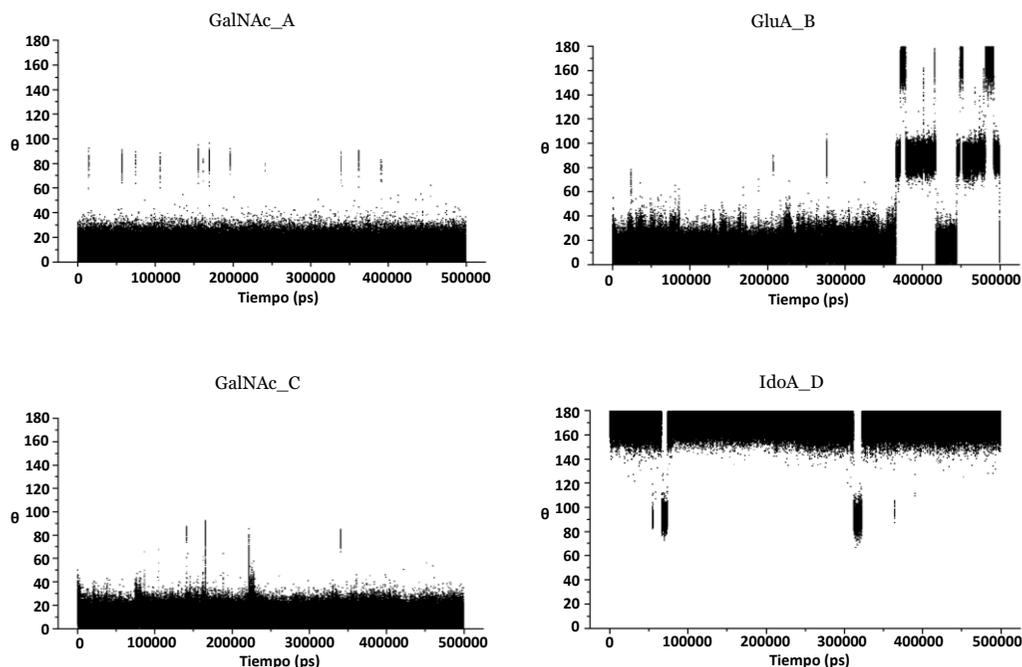
Pareja de átomos	Distancia experimental
H2A/H1A	3.06
H3A/H1A	2.48
H5A/H1A	2.27
H3B/H1B	2.58
H5B/H1B	2.37
H3A/H1B	2.56
H2D/H5D	2.83
H4D/H5D	2.40

**Tabla 4.2.1.2** Distancias experimentales obtenidas a partir del experimento (NOESY) para el tetrasacárido **2**. Medidas a baja temperatura para los anillos A y B y a temperatura ambiente para el anillo D.

Para obtener una estructura del ligando libre que complementase la estructura obtenida de forma experimental se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular de 500 ns para este tetrasacárido. Así, el análisis de las trayectorias obtenidas mediante las dinámicas moleculares ayudaría a elucidar el supuesto equilibrio conformacional del anillo de IdoA. En la **figura 4.2.1.3** se muestran la coordenada de plegamiento  $\theta$  para cada anillo del tetrasacárido **2**. Como se puede observar los dos anillos de GalNAc no

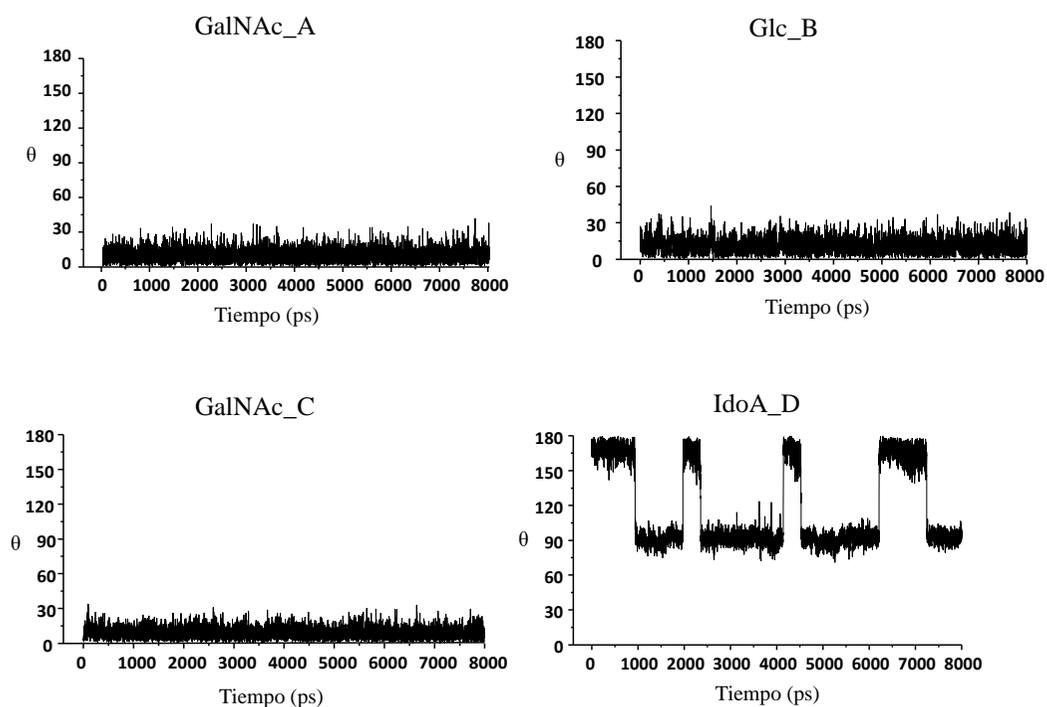
varía la conformación siendo esta  ${}^4C_1$  ya que  $\theta$  presenta valores entre 0-30°C tal y como se esperaba según el comportamiento general de los anillos de galactosamina. Sin embargo, los anillos de ácido urónico sí cambian de conformación a lo largo de la simulación. Sorprendentemente, el anillo de GlcA aunque se mantiene estable más de un 70% de la simulación presenta un equilibrio conformacional ( ${}^4C_1$ ,  ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$ ) a partir de la 4/5 parte de la trayectoria (**figura 4.2.1.3**). El anillo de IdoA presenta el equilibrio esperado entre las conformaciones  ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$  cuando se realiza una dinámica molecular sin restricciones, sin embargo, el porcentaje de  ${}^2S_0$  encontrado es muy bajo todo lo contrario a lo observado de forma experimental.

Si se compara el comportamiento obtenido mediante las coordenadas de plegamiento del IdoA de este tetrasacárido con los otros dos de la misma serie se puede afirmar que las coordenadas de plegamiento para el IdoA varían en función de la adición de grupos sulfato y protectores. Ya que el IdoA en el tetrasacárido **1** (no protegido) mostraba un equilibrio conformacional  ${}^4C_1$ ,  ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$ , el del tetrasacárido **3** (persulfatado) una estabilidad conformacional  ${}^1C_4$  y el del tetrasacárido **2** un equilibrio conformacional  ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$ .

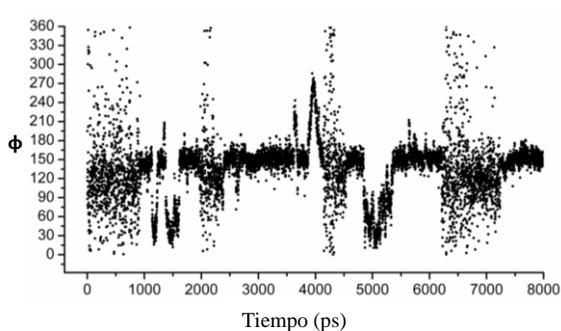


**Figura 4.2.1.3** Representación de la coordenada de plegamiento  $\theta$ , la cual indica la conformación para cada uno de los cuatro anillos del tetrasacárido **2** obtenidas de una DM libre a 500 ns.

Debido a que las conformaciones de los anillos de GlcA e IdoA obtenidas de las simulaciones moleculares no coinciden durante toda la simulación con los NOEs experimentales se llevó a cabo una dinámica molecular con restricciones promedias en el tiempo de 8 ns para obtener estructuras teóricas compatibles con las experimentales. Para ello se utilizaron distancias experimentales basadas en NOE como H1-H5 de 2.37 Å para el GlcA y H2-H5 de 2.83 Å para el anillo IdoA. En este caso, la **figura 4.2.1.4** muestra que para el anillo B la conformación se mantiene en  $\theta$  0-30° indicando una única conformación  ${}^4C_1$  durante toda la trayectoria. Para el IdoA se mantiene el mismo equilibrio encontrado en la simulación libre pero con un porcentaje para la conformación de  ${}^2S_0$  bastante mayor, un 65% ( $\theta = 90$ ). Si se observa el gráfico D de la misma figura se representa la coordenada  $\phi$  para el anillo D indicando una conformación mayoritaria de  ${}^2S_0$ , pero también se observan las conformaciones  ${}^3S_1$  y  ${}^1S_5$  durante muy poco tiempo. Por lo tanto, para un anillo de IdoA con una distancia H2/H5 de 2.83 Å existe un equilibrio conformacional entre  ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$  mayoritariamente. Se lanzó otra DM con las mismas restricciones pero con la conformación del anillo de IdoA en  ${}^2S_0$  para determinar si partiendo de esa estructura la conformación se mantenía constante. El porcentaje de  ${}^2S_0$  e  ${}^1C_4$  era prácticamente el mismo lo que prueba la consistencia de los datos.



IdoA-D



**Figura 4.2.1.4** Coordenadas  $\theta$  para los anillos que forman el tetrasacárido **2** (A, B, C y D) y coordenada  $\phi$  para el anillo IdoA el cual presenta un equilibrio conformacional (nótese que la coordenada  $\phi$  no está definida para valores de  $\theta$  0 o 180°)

A continuación se van a exponer los resultados cuantitativos obtenidos de la dinámica molecular comparándolos con los experimentales obtenidos mediante RMN. Las distancias entre los hidrógenos de los anillos y la de los enlaces glicosídicos junto con las constantes de acoplamiento son propiedades de los GAGs necesarias para determinar el equilibrio del IdoA, las conformaciones de los demás anillos y la flexibilidad conformacional del tetrasacárido **2**

Se ha llevado a cabo un promedio de las  $^3J_{HH}$  obtenidas durante toda la trayectoria de las dinámicas moleculares con y sin restricciones (**tabla 4.2.1.3**). Dichos valores muestran una conformación  $^4C_1$  para los anillos A, B y C al igual que las constantes de acoplamiento experimentales. Sin embargo, el anillo IdoA exhibe valores de  $^3J_{HH}$  diferentes tanto experimentales como teóricos. Claramente, las constantes obtenidas en la dinámica sin restricciones son pequeñas indicando una conformación  $^1C_4$ , tal y como mostraba la coordenada de plegamiento, sin embargo, las  $^3J_{HH}$  analizadas de la dinámica con restricciones muestran el equilibrio conformacional característico de este anillo. En ninguno de los dos casos, estas constantes reflejan los datos experimentales ya que estos muestran una conformación  $^2S_0$  mayoritaria para el IdoA.

	$^3J_{HH}$ experimental	$^3J_{HH}$ dinámica libre	$^3J_{HH}$ dinámica restricciones
H1A/H2A	8.5	8.2	8.2
H2A/H3A		10.4	10.4
H3A/H4A	3.5*	2.6	2.8
H4A/H5A		0.96	0.9
H1B/H2B		6.5	7.5
H2B/H3B	8.3*	9.3	8.9
H3B/H4B	8.7	7.9	8.6

H4B/H5B	10.4	8.7	9.9
H1C/H2C		8.2	8.3
H2C/H3C	7.8	10.5	10.5
H3C/H4C	2.2	2.6	2.9
H4C/H5C	1.2	0.9	1.3
H1D/H2D	5.6	1.8	3.8
H2D/H3D	9.9	1.3	5.9
H3D/H4D	6.0	2.8	4.2

**Tabla 4.2.1.3** Constantes de acoplamiento experimentales ( $S^3$ -HMBC) y teóricas (DM con y sin restricciones) para el tetrasacárido **2** medidas a 298K.

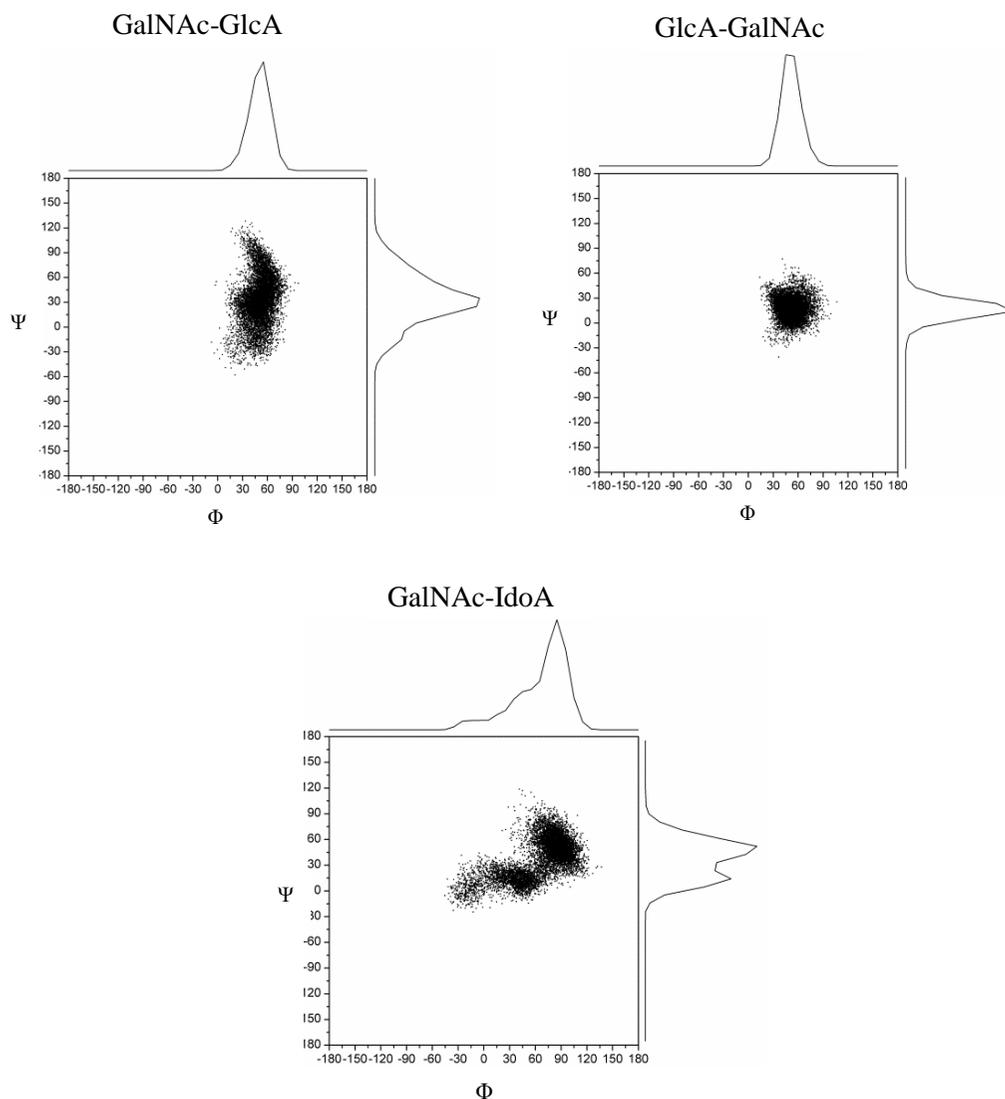
Los resultados de distancias tanto experimentales como teóricas del tetrasacárido **2** se muestran en la **tabla 4.2.1.4**. En este caso para los anillos A y B se muestra una conformación  ${}^4C_1$ . Para el anillo D la distancia entre los hidrógenos H2/H5 medida en la dinámica libre es muy grande indicando una conformación  ${}^4C_1$ , en la dinámica con restricciones es más corta indicando un equilibrio entre las dos especies  ${}^1C_4$  y  ${}^2S_0$ , sin embargo, la distancia experimental para la misma pareja de átomos es bastante más corta indicando una conformación  $2S_0$  de forma mayoritaria.

Pareja de átomos	Distancia experimental	Distancia dinámica libre	Distancia dinámica restricciones
H2A/H1A	3.06	3.04	3.05
H3A/H1A	2.48	2.68	2.72
H5A/H1A	2.27	2.59	2.57
H3B/H1B	2.58	3.01	2.72
H5B/H1B	2.37	2.61	2.51
H3A/H1B	2.56	2.57	2.78
H2D/H5D	2.83	4.02	3.25
H4D/H5D	2.40	4.26	2.37

**Tabla 4.2.1.4** Distancias experimentales (NOESY) y teóricas (DM con y sin restricciones) para el tetrasacárido **2**. Medidas a baja temperatura para los anillos A y B y a temperatura ambiente para el anillo D.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la flexibilidad conformacional de los enlaces glicosídicos del tetrasacárido **2**. Para estudiar la flexibilidad de forma teórica se presentan en la **figura 4.2.1.5** las trayectorias ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) de los ángulos glicosídicos. Todos los ángulos muestran una conformación  $\text{syn-}\Psi$  para dicho enlace a pesar de que el

enlace intermedio es el menos flexible siendo los otros dos enlaces formados por GlcA/IdoA-GalNAc menos rígidos en  $\Psi$  y  $\Phi$  respectivamente.



**Figura 4.2.1.5** Trayectorias ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) de los enlaces glicosídicos del tetrasacárido 2.

Después de obtener las características estructurales de este tetrasacárido dibencilado se debe de analizar la influencia de los bencilos en esta estructura comparándola con la del tetrasacárido sin proteger comentada en los antecedentes. Se van a comparar las distancias experimentales (**tabla 4.2.1.5**) para los tetrasacáridos **1** y **2**. La conformación para los anillos de GalNAc y GlcA es  ${}^4C_1$  en los dos tetrasacáridos tal y como muestran las distancias experimentales. Sin embargo, aunque las distancias obtenidas para los

anillos de IdoA en ambos tetrasacáridos sean parecidas indicando la misma conformación con los demás datos experimentales analizados se ha concluido que dicho anillo para el tetrasacárido **2** muestra una conformación más fija en  ${}^2S_0$  que el del tetrasacárido **1**.

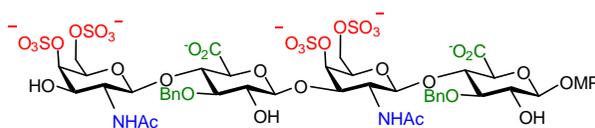
	Tetrasacárido <b>1</b>	Tetrasacárido <b>2</b>
H2A/H1A	3.06	3.06
H3A/H1A	2.51	2.48
H5A/H1A	2.48	2.27
H3B/H1B	2.59	2.58
H5B/H1B	2.34	2.37
H3A/H1B	2.44	2.56
H2D/H5D	2.74	2.83
H4D/H5D	2.83	2.40
H3C/H1D	2.22	

**Tabla 4.2.1.5** Tabla comparativa de las distancias experimentales medidas para el tetrasacárido **2** (protegido) y **1** (sin proteger).

### ➤ *Tetrasacárido 5.*

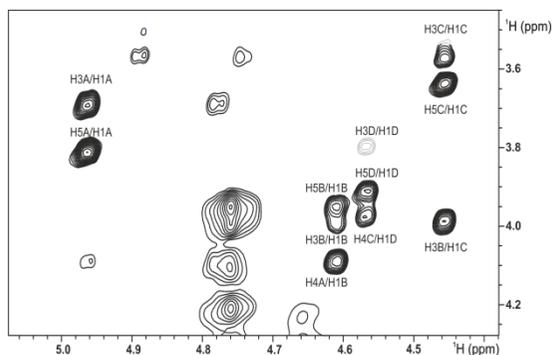
Se van a exponer los resultados obtenidos del análisis llevado a cabo para la determinación estructural de forma experimental y teórica del tetrasacárido **5** y se determinará las diferencias estructurales con su equivalente sin bencilar el tetrasacárido **4** previamente estudiado en el grupo.

La estructura del tetrasacárido **5** como ya se ha mencionado, es una secuencia de CS normal con patrón de sulfatación tipo E y con dos bencilos en las posiciones 3 de los anillos de GlcA (**figura 4.2.1.6**).



**Figura 4.2.1.6** Estructura del tetrasacárido **5** que presenta una secuencia CS tipo E con dos grupos bencilos en los anillos de GlcA.

Para determinar la estructura molecular del tetrasacárido libre se llevó a cabo un experimento NOESY a 700 MHz, 300 K y 600 ms de tiempo de mezcla (**figura 4.2.1.7**). Con este experimento se puede determinar la conformación de los distintos residuos que forman el tetrasacárido y su estructura tridimensional global cualitativamente. Estos picos NOEs indican que todos los anillos tanto de GlcA como GalNAc presentan una conformación canónica de silla  ${}^4C_1$ . Se pueden observar los picos de cruce característicos para esa conformación tales como H1X/H3X y H1X/H5X, X hace referencia a cualquiera de los anillos. Debido a la poca diferencia en el desplazamiento químico entre los protones H3 y H5 en todos los anillos no fue posible su asignación y cuantificación. Los protones H4 de los anillos de GlcNAc se encuentran muy próximos a la señal de D<sub>2</sub>O los cuales no pudieron ser cuantificados. Los NOEs más significativos son los que están nombrados en el espectro. Además, también se puede observar los NOEs interglucosídicos característicos de una conformación *syn-Ψ* (H4A/H1B, H3B/H1C, H4C/H1D) (véase **figura 4.2.1.7**).



**Figura 4.2.1.7** Espectro 2D-NOESY a 600 ms y 298K del tetrasacárido **5** medido a partir del experimento NOESY. Los picos de cruce NOEs más significativos están asignados.

Las constantes de acoplamiento proporcionan gran información acerca de la conformación anular de los diferentes residuos que forman los tetrasacáridos facilitando información de la disposición axial o ecuatorial de los hidrógenos. Las  ${}^3J_{HH}$  medidas de forma experimental mediante experimentos  ${}^1H$ -RMN y  ${}^1H$ -TOCSY (**tabla 4.2.1.6**) son valores altos indicando una conformación  ${}^4C_1$  para los anillos GalNAc al igual que los anillos de GlcA que también presentan conformación de silla  ${}^4C_1$ .

Pareja de hidrógenos	${}^3J_{HH}$ experimental	Pareja de hidrógenos	${}^3J_{HH}$ experimental
----------------------	---------------------------	----------------------	---------------------------

H1A/H2A	6.7	H1C/H2C	7.7
H2A/H3A	9.0	H2C/H3C	8.5
H3A/H4A	8.4	H3C/H4C	8.8
H4A/H5A	9.4	H4C/H5C	9.9
H1B/H2B	8.3	H1D/H2D	8.4
H2B/H3B	10.4	H2D/H3D	10.8
H3B/H4B	2.7*	H3D/H4D	3.1*
H4B/H5B	2.7*	H4D/H5D	3.3*

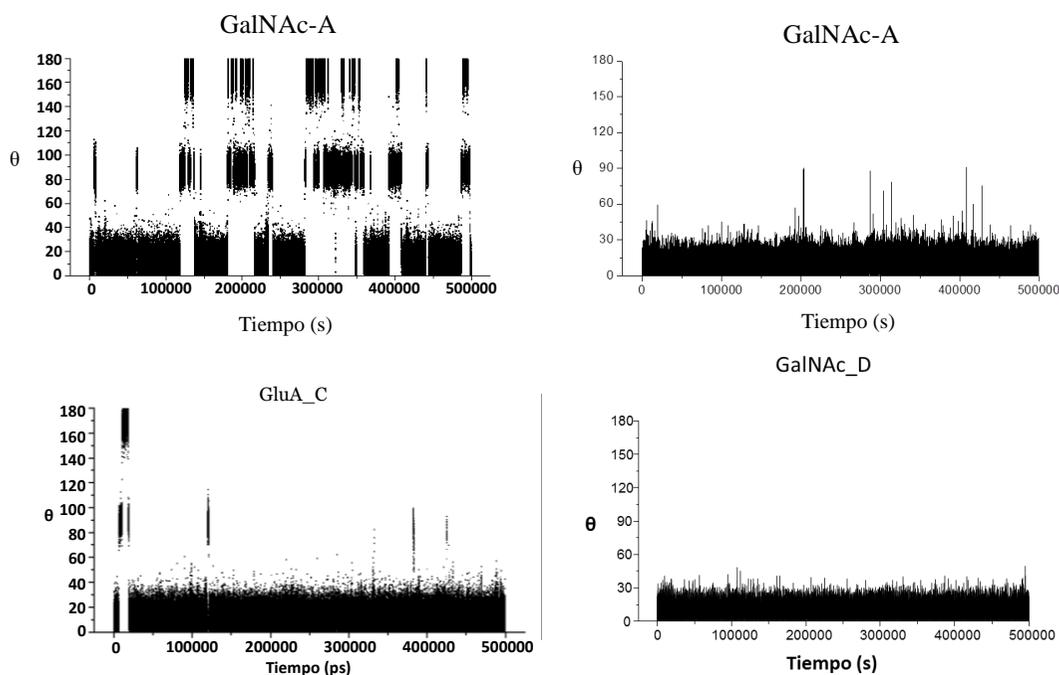
**Tabla 4.2.1.6** Valores de  $^3J_{HH}$  experimental medidos a 298K para el tetrasacárido dibencilado **5**.

Para determinar con mayor precisión la posible influencia de los sustituyentes en la estructura molecular se realizó un estudio cuantitativo de las distancias experimentales. Para ello se realizaron experimentos NOESY a diferentes tiempo de mezcla, a 298K y a 600 MHz y así obtener la curva de crecimiento del NOE. Los tiempos de mezcla utilizados fueron: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 ms. Las distancias representadas en la **tabla 4.2.1.7** vuelven a revelar una conformación de silla para todos los anillos ya que se observan distancias cortas para los hidrógenos interanulares. La única distancia experimental un poco más larga es la H5C/H1C lo cual puede indicar una posible distorsión del anillo de GlcA interno debido a la presencia de grupos bencilos como sustituyentes.

Pareja de hidrógenos	Distancia experimental
H3A/H1A	2.60*
H5A/H1A	2.78
H3B/H1B	2.60
H5B/H1B	2.60
H4A/H1B	2.95
H3C/H1C	2.60
H5C/H1C	3.04
H3B/H1C	2.75
H3D/H1D	2.60
H5D/H1D	2.87
H4C/H1D	2.70

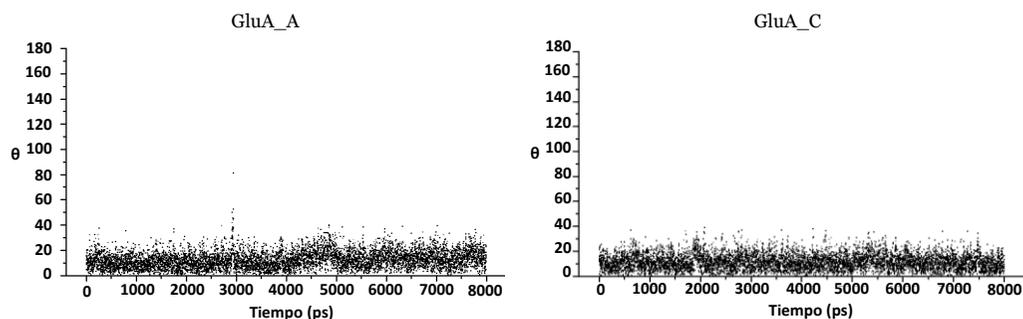
**Tabla 4.2.1.7** Distancias experimentales obtenidas de la curva de crecimiento del NOE a 298K para el tetrasacárido **5**.

Para obtener una estructura del ligando libre que complementase la estructura obtenida de forma experimental se llevó a cabo una dinámica molecular de 500 ns para este tetrasacárido. Las coordenadas de plegamiento (de Cremer-Pople) obtenidas de la DM se representan en los gráficos de la **figura 4.2.1.8**. Se puede observar que la conformación para los dos anillos de GlcNAc, como cabría esperar, no varía a lo largo del tiempo manteniéndose en  ${}^4C_1$ . Sin embargo los anillos de GlcA tanto el que se encuentra en el extremo (GlcA\_A) como el intermedio (GlcA\_C) varían la conformación a lo largo del tiempo aunque el anillo de GlcA\_C sólo varía al principio de la producción de la dinámica manteniéndose constante con una conformación de  ${}^4C_1$  durante aproximadamente 480 ns, lo cual indica que este anillo está más restringido que el A debido a que se encuentra en medio de dos anillo que GalNAc. La incorporación de un grupo bencilo en la posición 3 del anillo A le provoca un mayor movimiento que en el anillo C. No existen evidencias de que esto ocurra de forma experimental ya que los picos NOEs obtenidos indicaban sólo una conformación  ${}^4C_1$  por lo que los datos teóricos no coinciden con los resultados experimentales. Así, mientras los datos experimentales nos indican una conformación  ${}^4C_1$  de forma cualitativa para el anillo A, las conformaciones teóricas obtenidas para tal anillo son  ${}^4C_1$ ,  ${}^1C_4$  y  ${}^3B_0$ .



**Figura 4.2.1.8** Coordenadas de cremer ( $\theta$ ) para los cuatro anillos del tetrasacárido **5** obtenidas de la dinámica libre de 500 ns.

La evidente discrepancia entre la simulación y los datos experimentales en el caso del anillo A nos llevó a emplear una dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo de 8 ns. Para ello se utilizó la distancia de referencia de H1/H5 obtenida de forma experimental para el anillo A y el C como restricción. Los resultados obtenidos basados en las coordenadas de plegamiento  $\theta$  para cada anillo de GlcA muestran que la dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo sí proporciona una conformación  ${}^4C_1$  a lo largo de los 8 ns para los dos anillos de GlcA. La **figura 4.2.1.9** muestra las coordenadas de plegamiento obtenidas para los dos anillos de GlcA. Para ambos anillos la conformación es consistente con los resultados experimentales.



**Figura 4.2.1.9** Coordenada de plegamiento  $\theta$  para los dos anillos de GlcA obtenida de la dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo de 8 ns. Las restricciones fueron usadas sólo para los dos anillos de GlcA.

Las constantes teóricas se han medido mediante la ecuación de Altona. En todos los casos se puede observar en la **tabla 4.2.1.8** que las  ${}^3J_{HH}$  obtenidas de forma experimental coincide con las teóricas indicando una conformación  ${}^4C_1$  para todos los anillos.

	${}^3J_{HH}$ experimental	${}^3J_{HH}$ dinámica libre	${}^3J_{HH}$ dinámica restricciones
H1A/H2A	6.7	5.7	7.6
H2A/H3A	9.0	6.7	9.1
H3A/H4A	8.4	6.5	8.5
H4A/H5A	9.4	7.8	9.8
H1B/H2B	8.3	8.3	8.3
H2B/H3B	10.4	10.4	10.4
H3B/H4B	2.7	2.8	2.8
H4B/H5B	2.7	1.1	1.1
H1C/H2C	7.7	7.3	7.5
H2C/H3C	8.5	8.7	8.9

H3C/H4C	8.8	8.4	8.6
H4C/H5C	9.9	9.7	9.9
H1D/H2D	8.4	8.3	8.3
H2D/H3D	10.8	10.6	10.5
H3D/H4D	3.1	3.0	2.9
H4D/H5D	3.3	1.3	1.2

**Tabla 4.2.1.8** Constantes de acoplamiento medidas de forma experimental y de la DM con y sin restricciones para el tetrasacárido **5** a 298K y a 600 MHz.

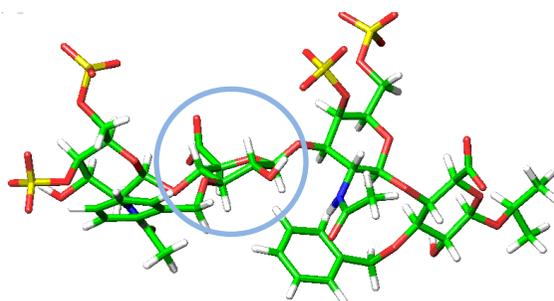
Además de las constantes de acoplamiento se midieron las distancias de las simulaciones de la dinámica con y sin restricciones. Todas las distancias obtenidas de la dinámica con restricciones son indicativas de una conformación  ${}^4C_1$  confirmando los datos experimentales. Además, la distancia más larga obtenida de forma experimental H1/H5 para el anillo C, es más corta en las dinámicas ya que estas muestran una conformación fija de  ${}^4C_1$ .

	Distancia experimental	Distancia dinámica libre	Distancia dinámica restricciones
H3A/H1A	2.60*	3.21	2.50
H5A/H1A	2.78	2.78	2.65
H3B/H1B	2.60	2.61	2.59
H5B/H1B	2.60	2.56	2.55
H4A/H1B	2.95	2.62	2.50
H3C/H1C	2.60	2.79	2.73
H5C/H1C	3.04	2.55	2.47
H3B/H1C	2.75	2.56	2.58
H3D/H1D	2.60	2.56	2.59
H5D/H1D	2.87	2.53	2.54
H4C/H1D	2.70	2.47	2.51

\* Señal parcialmente solapada con los protones benéficos de los sustituyentes.

**Tabla 4.2.1.9** Distancias experimentales (columna de la izquierda), distancias teóricas obtenidas de la DM sin restricciones (columna central) y distancias teóricas obtenidas de la DM con restricciones (columna de la derecha).

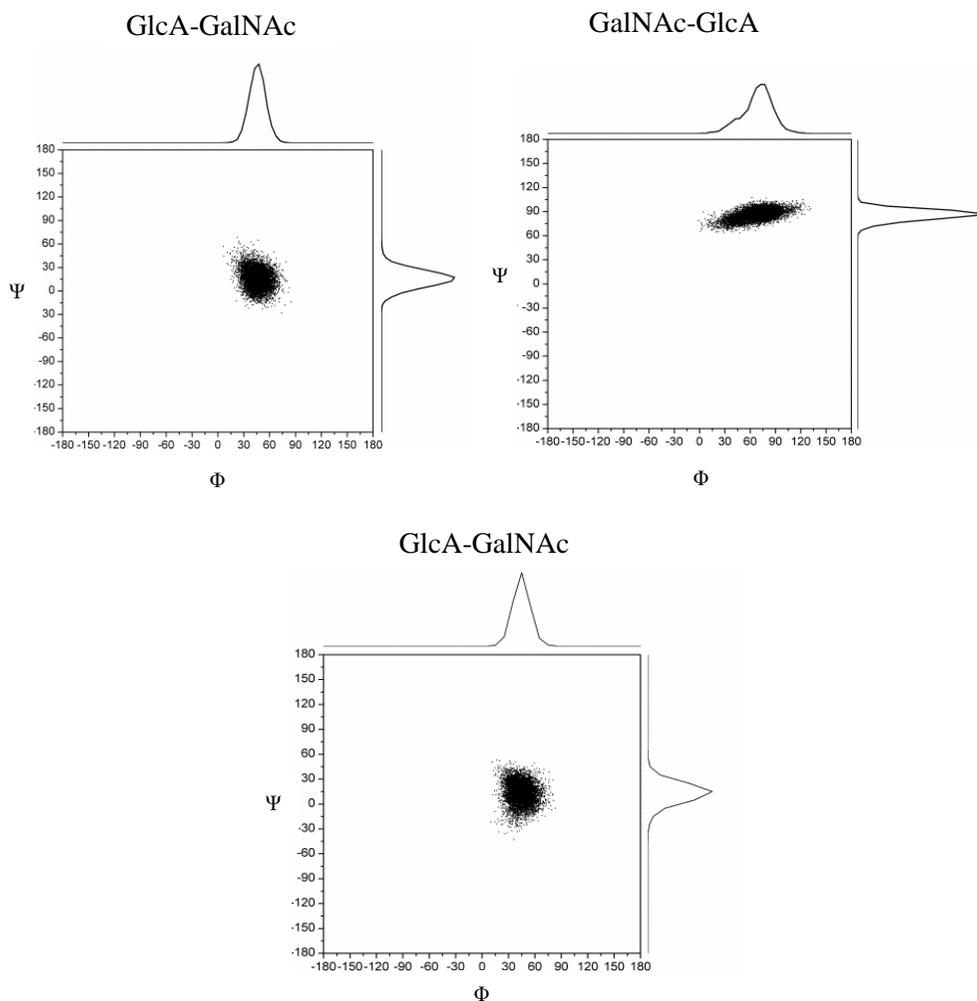
En la **figura 4.2.1.10** se muestra una estructura obtenida de la dinámica molecular libre. En ella se observa que el anillo C aunque tiene conformación  ${}^4C_1$  muestra cierta distorsión mostrando unas distancias H1-H5 y H1-H3 muy similares a las experimentales. Por eso se puede proponer que se produce una cierta influencia de la sustitución por grupos bencilos en la conformación aunque no es demasiado importante. Las distancias teóricas obtenidas de las DM tanto libre como con restricciones indican distancias similares para los anillos B y D ya que no cambian de conformación en ninguna de las dos dinámicas. Si comparamos las tres distancias para las parejas de protones que indican la conformación  ${}^4C_1$  se observa, como ya hemos supuesto anteriormente, que experimentalmente no se trata de una conformación  ${}^4C_1$  canónica ya que si fuese así debería de coincidir con las distancias obtenidas mediante la DM con restricciones. Si se analizan las distancias de los anillos de GlcA\_A se puede observar que las distancias obtenidas de la DM libre son muy diferentes a las obtenidas mediante la DM con restricciones que denotan una conformación  ${}^4C_1$ . Esto está de acuerdo con el análisis previo basado en las coordenadas de plegamiento y constantes de acoplamiento experimentales.



**Figura 4.2.1.10** Estructura del tetrasacárido **5** obtenida de la DM sin restricciones en la cual se observa una cierta distorsión del anillo C (GlcA).

Otro aspecto a tener en cuenta de las trayectorias son los ángulos de unión interglucosídicos. En la **figura 4.2.1.11** se muestran los mapas ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) de la trayectoria para cada una de las uniones glucosídicas para analizar el comportamiento conformacional de las uniones glucosídicas. Se deduce una geometría syn- $\Psi$  para todas las uniones. Además, la unión intermedia, la unión GalNAc-GlcA muestra un comportamiento diferente con respecto a las otras dos uniones aunque la geometría de dicho enlace no cambia. De forma experimental se mostraban los picos NOEs que indican una conformación syn- $\psi$  al igual que se refleja en la trayectoria de la DM pero

las distancias experimentales son un poco largas incluso más largas que las distancias teóricas indicando que hay cierta tensión en la estructura.



**Figura 4.2.1.11** Trayectorias ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) para cada una de las uniones glicosídicas del tetrasacárido **5**.

Se van a comparar los datos experimentales obtenidos para el tetrasacárido **5** con su equivalente sin proteger, el tetrasacárido **4**. Las distancias interglicosídicas experimentales para el tetrasacárido **4** son más cortas que para el **5** lo que puede indicar que hay una posible influencia en las uniones interglicosídicas de la tensión generada por la introducción de sustituyentes, aunque no cambien su geometría. No se observa de forma experimental ningún NOE interglicosídico que indique cualquier otra geometría. Ver **tabla 4.2.1.6** para las distancias comparativas de ambos tetrasacáridos.

---

Tetrasacárido **4**   Tetrasacárido **5**

---

H3A/H1A	2.78	2.60
H5A/H1A	2.17	2.78
H3B/H1B	2.38	2.60
H5B/H1B	2.37	2.60
H4A/H1B	2.10	2.95
H3C/H1C	2.50	2.60
H5C/H1C	2.14	3.04
H3B/H1C	2.28	2.75
H3D/H1D	2.56	2.60
H5D/H1D	2.49	2.87
H4C/H1D	2.27	2.70

**Tabla 4.2.1.10** Tabla representativa de las distancias experimentales del tetrasacárido **5** (protegido) y **4** (sin proteger) medidas a 298K.

Se han podido medir más constantes de acoplamiento del tetrasacárido **5** que del **4** pero para el anillo C se observan en los dos casos constantes de acoplamiento típico de la conformación  ${}^4C_1$  (**tabla 4.2.1.7**).

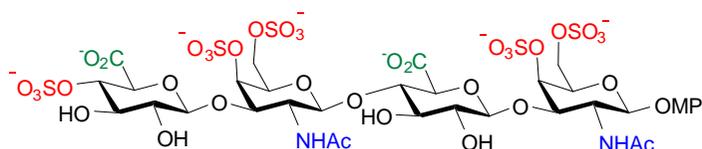
	Tetrasacárido <b>4</b>	Tetrasacárido <b>5</b>
H1A/H2A	8.0	6.7
H2A/H3A		9.0
H3A/H4A		8.4
H4A/H5A		9.4
H1B/H2B	7.6	8.3
H2B/H3B		10.4
H3B/H4B		2.7
H4B/H5B		2.7
H1C/H2C	7.8	7.7
H2C/H3C	8.7	8.5
H3C/H4C	9.0	8.8
H4C/H5C	9.7	9.9
H1D/H2D	7.7	8.4
H2D/H3D		10.8
H3D/H4D	2.7	3.1
H4D/H5D		3.3

**Tabla 4.2.1.11** Tabla representativa de las constantes de acoplamiento experimentales del tetrasacárido **5** (bencilado) y **4** (no protegido).

➤ **Tetrasacáridos 7 y 8.**

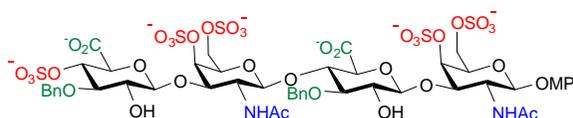
En este último apartado se discutirán los resultados obtenidos para el tetrasacárido **7** (sin proteger) y el **8** (dibencilado), los dos con la misma secuencia (GlcA – GalN – GlcA – GalN) siendo complementaria a **4** y **5**. Se determinó la estructura tridimensional de ambos empleando la estrategia anteriormente descrita. Para ello se llevaron a cabo los mismos experimentos de asignación de ambos tetrasacáridos (ver anexo). También se construyó las curvas de crecimiento del NOE a partir de estas se determinó las distancias experimentales y, por último, se realizó el análisis de las torsiones interanulares mediante las constantes de acoplamiento.

La estructura del tetrasacárido **7** se representa en la **figura 4.2.1.12** la cual es una secuencia de CS alternada comenzando por el anillo de GalNAc en el extremo reductor.



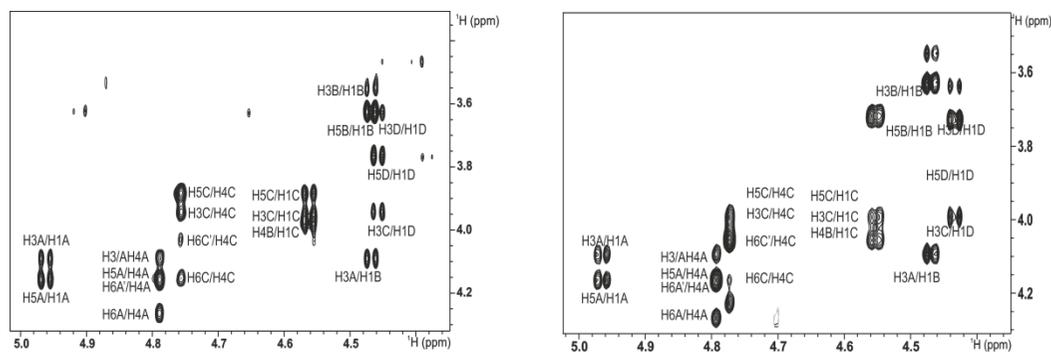
**Figura 4.2.1.12** Tetrasacárido **7** de secuencia CS tipo E. Incluye un grupo sulfato en posición 4 del extremo no reductor.

La estructura del tetrasacárido **8** se muestra en la **figura 4.2.1.13**, presenta la misma secuencia que el tetrasacárido **7** pero con dos grupos bencilos en los anillos de GlcA.



**Figura 4.2.1.13** Estructura del tetrasacárido **8** que presenta una secuencia CS tipo E alternada más un grupo sulfato en posición 4 del anillo GlcA del extremo no reductor y dos grupos bencilos en los anillos de GlcA.

En la **figura 4.2.1.14** se muestran los dos espectros obtenidos para el tetrasacárido **8** a la izquierda y el **7** a la derecha. En ambos espectros se observan los NOEs experimentales indicativos de la conformación  ${}^4C_1$  para todos los anillos independientemente de la presencia de los grupos bencilos al igual que ocurría con los otros dos grupos de tetrasacáridos. Al igual que para **5** se observan NOEs interglucosídicos compatibles con una conformación extendida.



**Figura 4.2.1.14** Espectros NOESY obtenidos para el tetrasacáridos **8** (izquierda) y **7** (derecha) a 600 ms y 298K.

Se midieron las constantes de acoplamiento para ambos tetrasacáridos. En la **tabla 4.2.1.12** se exponen las constantes de acoplamiento experimentales para el tetrasacárido **7**. Todas ellas indican la misma conformación  ${}^4C_1$  para todos los anillos tal y como era de esperar al no presentar sustituyentes aromáticos.

Pareja de átomos	${}^3J_{HH}$ experimental	Pareja de átomos	${}^3J_{HH}$ experimental
H1A/H2A	8.6	H1C/H2C	8.5
H2A/H3A	9.7	H2C/H3C	10.9
H3A/H4A	3.1	H3C/H4C	2.1
H4A/H5A		H4C/H5C	
H1B/H2B	8.0	H1D/H2D	8.0
H2B/H3B	9.0	H2D/H3D	9.7
H3B/H4B	9.0	H3D/H4D	9.7
H4B/H5B	9.9	H4D/H5D	10.3

**Tabla 4.2.1.12** Constantes de acoplamiento experimentales medidas a 298K para el tetrasacárido **7**.

Las constantes de acoplamiento para el tetrasacárido **8** son representadas en la **tabla 4.2.1.13**. En este caso, al igual que para el tetrasacárido **7** son indicativas de una conformación  ${}^4C_1$  para los cuatro anillos que forman el oligosacárido. Por lo tanto, no hay ninguna evidencia experimental, a falta de los valores de distancias, que asegure un cambio en la estructura a causa de la bencilación en los anillos de GlcA.

Pareja de átomos	${}^3J_{HH}$ experimental	Pareja de átomos	${}^3J_{HH}$ experimental
H1A/H2A	8.6	H1C/H2C	8.8
H2A/H3A	10.8	H2C/H3C	10.9
H3A/H4A	3.1	H3C/H4C	2.8
H4A/H5A		H4C/H5C	
H1B/H2B	7.4	H1D/H2D	7.8
H2B/H3B	9.2	H2D/H3D	9.2
H3B/H4B	9.2	H3D/H4D	9.2
H4B/H5B	9.6	H4D/H5D	9.6

**Tabla 4.2.1.13** Valores medidos de forma experimental a 298K de las constantes de acoplamiento para el tetrasacárido **8**.

Se midieron las distancias interprotónicas experimentales para ambos tetrasacáridos **7** y **8** las cuales son representadas en la **tabla 4.2.1.14** y **4.2.1.15** respectivamente. En ambas se observan distancias pequeñas para todas las parejas de hidrógenos confirmando la misma conformación determinada mediante los NOEs,  ${}^3J_{HH}$  y distancias para todos los anillos de los tetrasacáridos.

Pareja de átomos	Distancia experimental	Pareja de átomos	Distancia experimental
H3A/H1A	2.60	H3C/H1C	2.60
H5A/H1A	2.69	H5C/H1C	2.70
H3B/H1B	2.60	H4B/H1C	2.91
H5B/H1B	2.90	H3D/H1D	2.60
H3A/H1B	2.70	H5D/H1D	2.91
		H3C/H1D	2.69

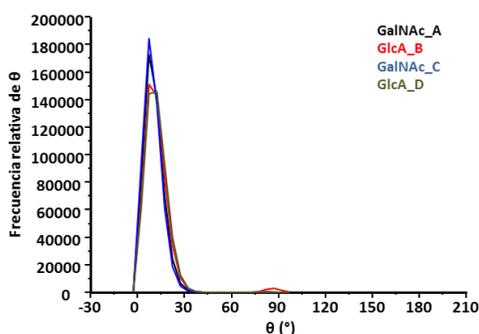
**Tabla 4.2.1.14** Distancias experimentales medidas a 298K para el tetrasacárido **7**.

Pareja de átomos	Distancia experimental	Pareja de átomos	Distancia experimental
H3A/H1A	2.60	H5C/H1C	2.60

H5A/H1A	2.54	H4B/H1C	2.79
H3B/H1B	2.60	H3D/H1D	2.60
H5B/H1B	2.73	H5D/H1D	2.94
H3A/H1B	2.43	H3C/H1D	2.71

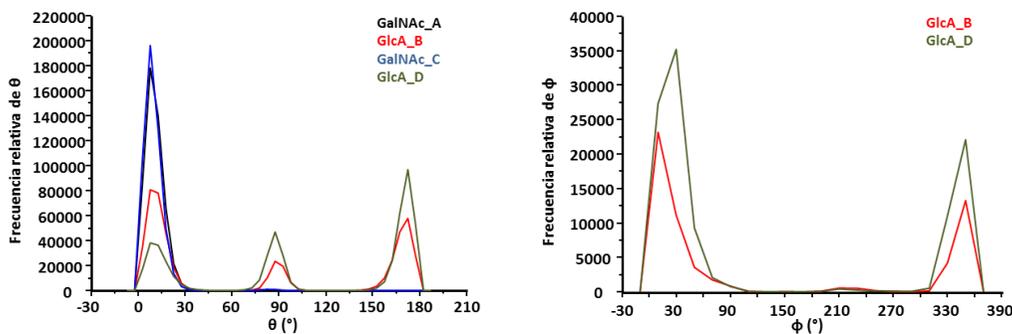
**Tabla 4.2.1.15** Distancias experimentales medidas a 298K para el tetrasacárido **8**.

Se procedió a simular el comportamiento conformacional mediante dinámica molecular sin restricciones durante 500 ns. En la **figura 4.2.1.15** se recogen las coordenadas de plegamiento  $\theta$  para los 4 anillos del tetrasacárido **7** de la dinámica libre. En este se observa una única conformación para los 4 anillos,  ${}^4C_1$  la cual no cambia a lo largo de toda la simulación ya que al no presentar grupos bencilos la simulación sin restricciones es compatible con la estructura experimental.



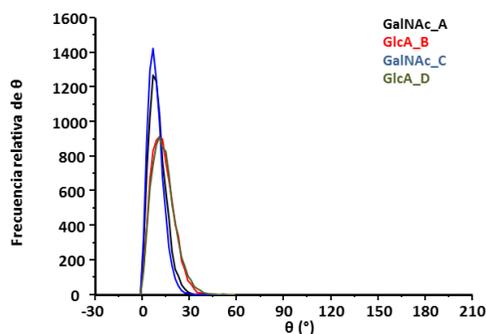
**Figura 4.2.1.15** Representación de la coordenada  $\theta$  para cada uno de los 4 anillos que forman el tetrasacárido **7** obtenidos de la dinámica molecular libre.

La **figura 4.2.1.16** representa las coordenadas  $\theta$  para los cuatro anillos del compuesto **8** y la coordenada  $\phi$  para los dos anillos de GlcA. Como se observa, los anillos de GalNAc se mantienen en  ${}^4C_1$  mientras tanto, los anillos de GlcA muestran un equilibrio entre las conformaciones  ${}^4C_1$ ,  ${}^1C_4$ , un bote  ${}^{3,0}B$  y dos botes torcidos  ${}^0S_2$  y  ${}^3S_1$ . Estas tres últimas conformaciones se producen cuando  $\theta$  es  $90^\circ$  y, obviamente, junto con la conformación  ${}^1C_4$  son imposibles de que se produzcan de forma experimental ya que los NOEs indican una conformación mayoritaria  ${}^4C_1$ . Este es un error de parametrización del campo de fuerzas que se manifiesta al incluir residuos voluminosos en, al menos los anillos de ácido glucurónico.



**Figura 4.2.1.16** Representación de la coordenada  $\theta$  (izquierda) para los 4 anillos del tetrasacárido **8**. A la derecha, representación de la coordenada  $\phi$  para los dos anillos de GlcA.

Debido a estas discrepancias se llevó a cabo una dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo. Las distancias de referencia utilizadas fueron H1/H3 de 2.60 Å para los anillos de GlcA y al ponerle restricciones, la conformación se mantiene en  ${}^4C_1$  para los dos anillos GlcA.



**Figura 4.2.1.17** Coordenada  $\theta$  para el tetrasacárido **8** obtenido mediante DM con restricciones.

La **tabla 4.2.1.16** muestra las constantes de acoplamiento H-H obtenidas al analizar las dinámicas moleculares con y sin restricciones para el tetrasacárido **7**. Las constantes obtenidas para las dos dinámicas son muy similares debido a que no se produce ningún cambio de conformación en ninguna de las dos simulaciones. Además, estos valores están totalmente de acuerdo con los experimentales.

${}^3J_{HH}$ experimental	${}^3J_{HH}$ dinámica libre	${}^3J_{HH}$ dinámica restricciones
---------------------------	-----------------------------	-------------------------------------

H1A/H2A	8.6	8.2	8.1
H2A/H3A	9.7	10.5	10.4
H3A/H4A	3.1	2.5	2.5
H4A/H5A		1.0	1.0
H1B/H2B	8.0	7.3	7.4
H2B/H3B	9.0	8.5	8.6
H3B/H4B	9.0	8.6	8.7
H4B/H5B	9.9	9.9	10.0
H1C/H2C	8.5	8.2	8.2
H2C/H3C	10.9	10.5	10.5
H3C/H4C	2.1	2.5	2.4
H4C/H5C		1.07	1.0
H1D/H2D	8.0	7.3	7.4
H2D/H3D	9.7	8.4	8.5
H3D/H4D	9.7	8.5	8.5
H4D/H5D	10.3	9.9	9.9

**Tabla 4.2.1.16** Constantes de acoplamiento experimentales y teóricas (medidas de la DM con y sin restricciones) para el tetrasacárido **7** a 298K y a 600 MHz.

Para el tetrasacárido **8** también se midieron las constantes de acoplamiento teóricas para las dos simulaciones. En este caso, las constantes de acoplamiento medidas para los GlcA son diferentes en los dos casos y, como es de esperar, las obtenidas de la dinámica con restricciones en la cual las conformaciones se mantienen constantes son las que corroboran los datos experimentales (**tabla 4.2.1.17**).

	$^3J_{HH}$ experimental	$^3J_{HH}$ dinámica libre	$^3J_{HH}$ dinámica restricciones
H1A/H2A	8.6	8.2	8.2
H2A/H3A	10.8	10.4	10.5
H3A/H4A	3.1	2.6	2.6
H4A/H5A		1.0	1.0
H1B/H2B	7.4	4.6	8.3
H2B/H3B	9.2	5.6	10.0
H3B/H4B	9.2	5.8	9.1
H4B/H5B	9.6	6.0	9.9
H1C/H2C	8.8	8.2	8.3

H2C/H3C	10.9	10.3	10.4
H3C/H4C	2.8	2.9	3.1
H4C/H5C		1.1	1.1
H1D/H2D	7.8	3.8	7.4
H2D/H3D	9.2	3.8	8.3
H3D/H4D	9.2	4.2	8.4
H4D/H5D	9.6	4.0	9.9

**Tabla 4.2.1.17** Constantes de acoplamiento experimentales y teóricas (medidas de la DM con y sin restricciones) para el tetrasacárido **8** a 298K y a 600 MHz.

Para un análisis más detallado se analizaron distancias obtenidas de forma teórica para el tetrasacárido **7** (**tabla 4.2.1.18**). Todas las distancias son compatibles con una conformación  ${}^4C_1$  para todos los anillos. En cuanto a la geometría global del tetrasacárido, las distancias están de acuerdo con una conformación extendida. La estructura determinada tanto de forma experimental como teórica para el tetrasacárido **7** es similar a la del tetrasacárido **4**.

	Distancia experimental	Distancia dinámica libre	Distancia dinámica restricciones
H3A/H1A	2.60	2.66	2.67
H5A/H1A	2.69	2.63	2.65
H3B/H1B	2.60	2.79	2.75
H5B/H1B	2.90	2.55	2.53
H3A/H1B	2.70	2.51	2.42
H3C/H1C	2.60	2.63	2.64
H5C/H1C	2.70	2.63	2.63
H4B/H1C	2.91	2.35	2.34
H3D/H1D	2.60	2.79	2.76
H5D/H1D	2.91	2.54	2.53
H3C/H1D	2.69	2.48	2.51

**Tabla 4.2.1.18** Distancias experimentales y teóricas del tetrasacárido **7** medidas a 298K y a 600 MHz.

Las distancias interprotónicas experimentales la conformación para el tetrasacárido **8** también coinciden con una conformación canónica  ${}^4C_1$  para las GlcNAc y para los GlcA hay un poco de desviación para el anillo D. Sin embargo la distancia H1/H5 del anillo B es algo más corta indicando que el anillo intermedio se fija más y que el anillo del extremo no reductor se desvía de su conformación aunque no cambia pero ocurre en los dos tetrasacáridos independientemente de los grupos bencilo.

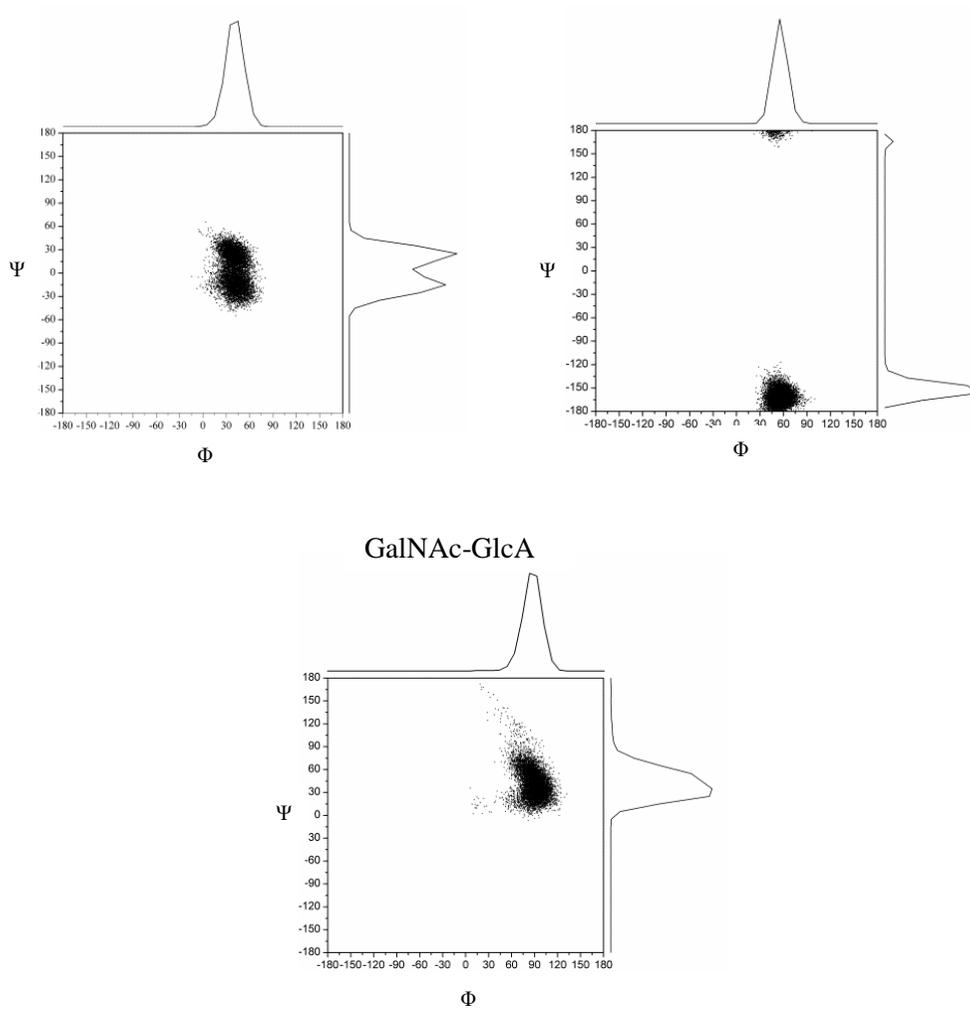
	Distancia experimental	Distancia dinámica libre	Distancia dinámica restricciones
H3A/H1A	2.60	2.67	2.65
H5A/H1A	2.54	2.60	2.54
H3B/H1B	2.60	2.39	2.73
H5B/H1B	2.73	3.06	2.50
H3A/H1B	2.43	2.47	2.36
H3C/H1C		2.67	2.63
H5C/H1C	2.60	2.55	2.51
H4B/H1C	2.79	2.86	3.63
H3D/H1D	2.60	3.76	2.77
H5D/H1D	2.94	3.31	2.50
H3C/H1D	2.71	2.55	2.47

**Tabla 4.2.1.19** Distancias experimentales y teóricas del tetrasacárido **8** medidas a 298K y a 600 MHz

Los ángulos de enlace glicosídicos mostrados en la **figura 4.2.1.18** para el tetrasacárido **8** reflejan que las uniones GlcA-GlcNAc de los extremos presentan un espacio conformacional más extenso que el mostrado por la unión central al igual que ocurre para el tetrasacárido **7** el cual no muestra grupos bencilos (**figura 4.2.1.19**). Aunque los muestren algo de flexibilidad la conformación  $\text{syn-}\Psi$  no cambia.

GalNAc-GlcA

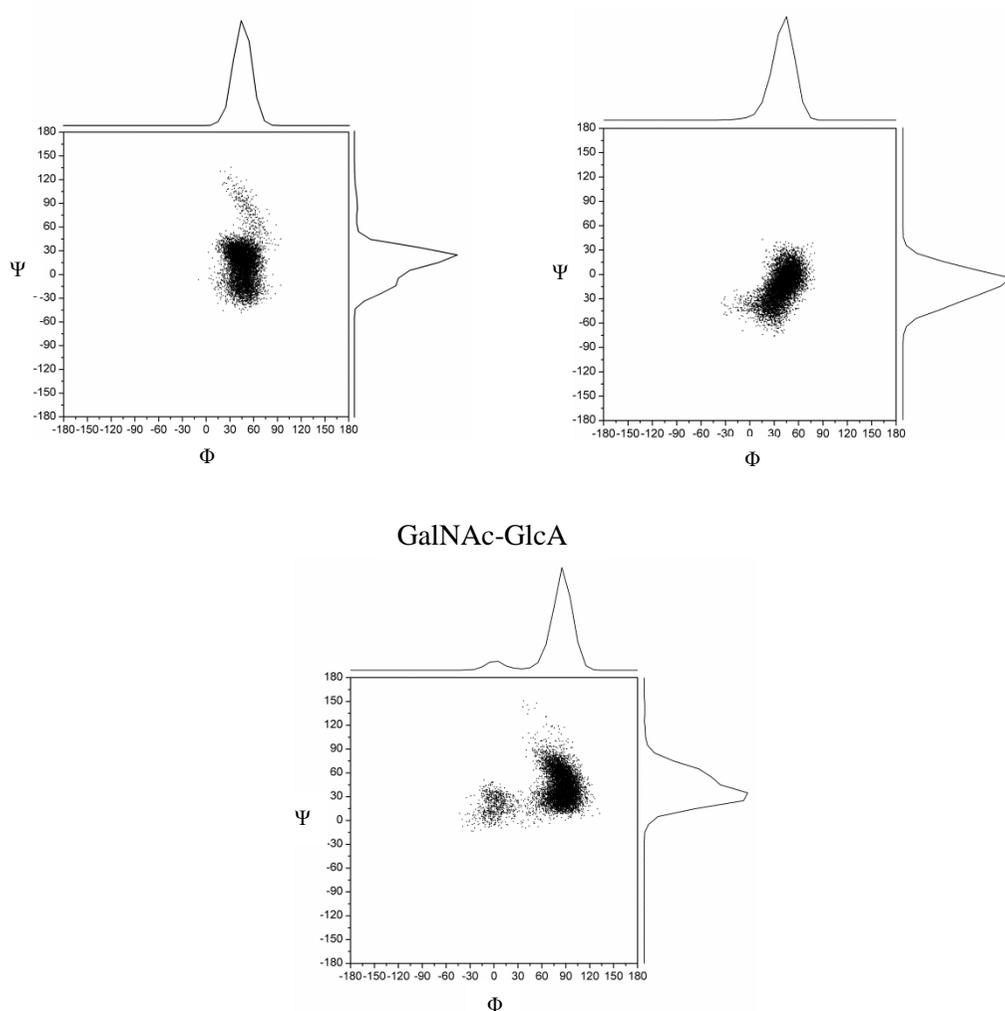
GalNAc-GlcA



**Figura 4.2.1.18** Trayectorias ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) para el tetrasacárido **8** obtenidos de la dinámica molecular con restricciones.

GalNAc-GlcA

GlcA-GalNAc



**Figura 4.2.1.19** Trayectorias ( $\Phi$ ,  $\Psi$ ) para el tetrasacárido **7** obtenidos de la dinámica molecular sin restricciones.

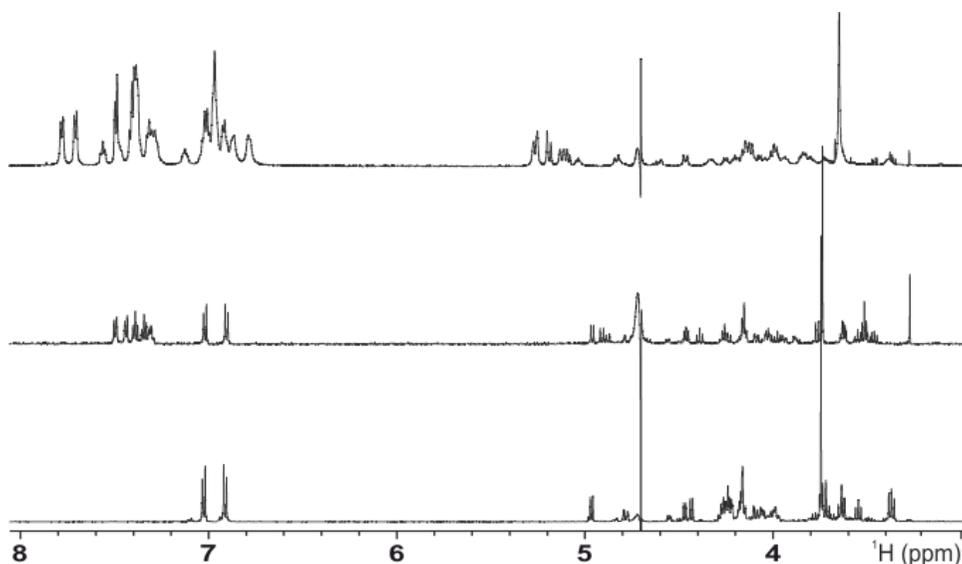
#### 4.2.1.2 Tetrasacáridos persustituidos con secuencia alternada. Agregación (compuestos **6** y **9**).

Los compuestos **6** y **9** mostrados en la **figura 4.2.1.20 A** y **B** respectivamente, presentan varios sustituyentes como bencilos y benzoilos en las posiciones 2, 3 y 6 de los anillos GlcA.



**Figura 4.2.1.20** Representación de las dos únicas estructuras persustituidas de todos los tetrasacáridos estudiados. La estructura A representa al tetrasacárido **6** y la B el **9**.

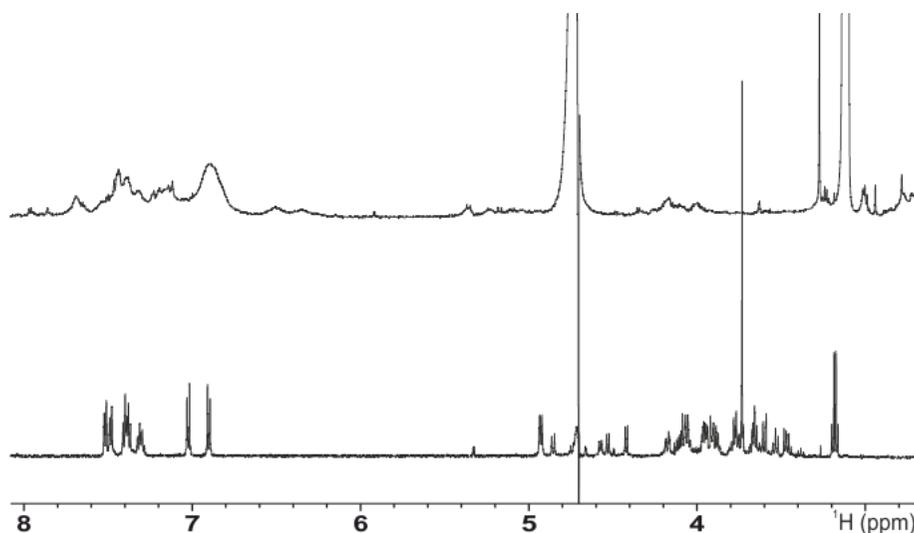
Tantos grupos hidrofóbicos podrían influir bastante en la estructura tridimensional de los dos tetrasacáridos comparada con sus equivalentes sin grupos protectores aromáticos. Tanto la densidad de carga como el volumen de estos grupos podrían afectar a la estructura tridimensional de los tetrasacáridos. Para determinar dicha estructura se realizaron experimentos de asignación a la misma concentración y condiciones que para los demás tetrasacáridos explicados en el apartado anterior. En la **figura 4.2.1.21** se muestran los espectros  $^1\text{H}$ -RMN para los tetrasacáridos **7** (no protegido), **8** (dibencilado) y **9** (persustituido) obtenidos a concentraciones altas y el mismo buffer. Se puede observar como al ir aumentando la proporción de grupos hidrofóbicos para la misma cantidad de grupos sulfato (espectro inferior es para el tetrasacárido **7**, el central para el **8** y el superior para el **9**) los espectros van cambiando obteniendo así espectros muy mal resueltos y con señales muy anchas para los tetrasacáridos persustituidos. Se puede suponer que debido a una agregación a causa de los grupos hidrofóbicos aumenta el tiempo de correlación proporcionando ese espectro.



**Figura 4.2.1.21** Espectros monodimensionales de los tetrasacáridos de la serie C. Tetrasacárido **7** a 1 mM (abajo), el **8** a 1 mM (central) y el **9** (arriba) a 1.5 mM y a 298K.

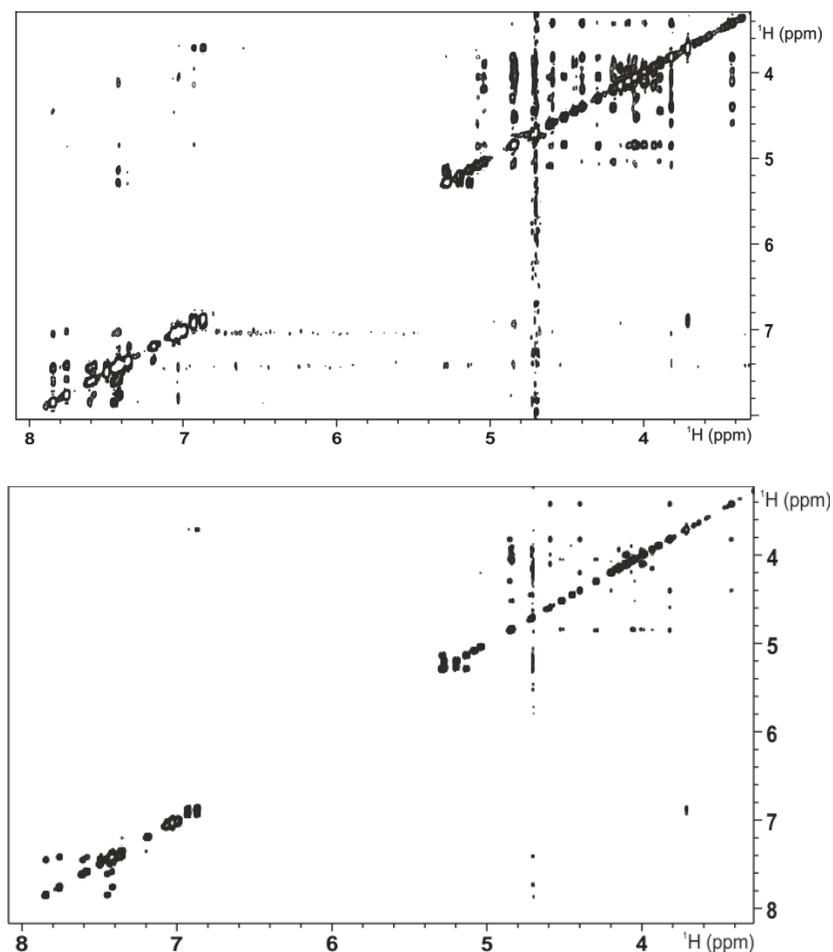
Los mismos experimentos monodimensionales y a las mismas condiciones que los mostrados anteriormente se realizaron para los tetrasacáridos (**5** y **6**) que forman la serie

B (**figura 4.2.1.22**). La diferencia entre ellos es el aumento de grupos protectores aromáticos. Al igual que para la serie C en este caso se pone de manifiesto que al aumentar los grupos aromáticos aumenta el tiempo de correlación de la especie en disolución y se obtiene un espectro de molécula grande incluso a baja concentración (270  $\mu\text{M}$ ) para el tetrasacárido **6**.



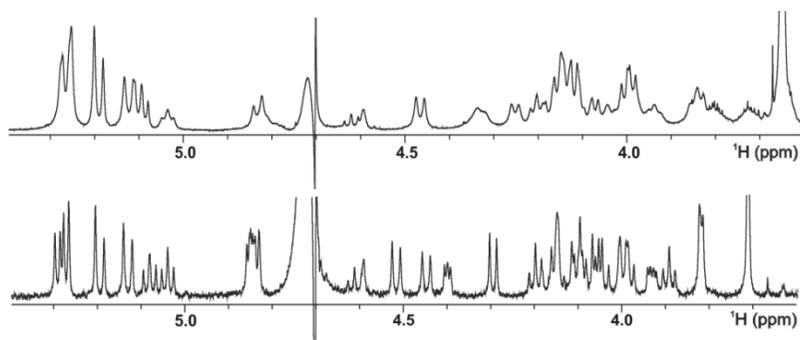
**Figura 4.2.1.22** Espectros monodimensionales de los tetrasacáridos de la serie B. Tetrasacárido **5** (abajo) a 1 mM y el **6** (arriba) a 270  $\mu\text{M}$  a 298K.

Para el tetrasacárido **9** se realizaron experimentos NOESY para determinar la estructura tridimensional del compuesto los cuales también refleja la agregación producida (**figura 4.2.1.23**). El espectro superior representa al tetrasacárido con una concentración alta de ligando (1.5 mM) y el inferior con una concentración baja de 230  $\mu\text{M}$ . Se puede observar que el espectro de concentración alta presenta una gran cantidad de picos NOEs debido a la agregación. Esto es posible por la gran difusión de espín provocada por un gran aumento de los tiempos de correlación que generan especies de gran tamaño.



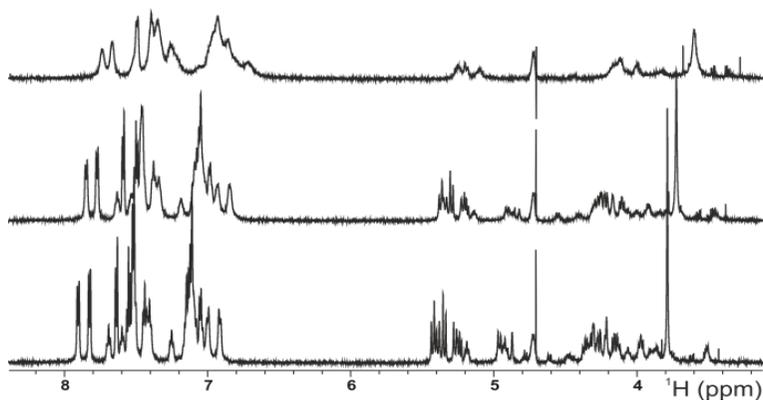
**Figura 4.2.1.23** Espectros NOESY para el tetrasacárido **9** a 1.5 mM (arriba) y a 230  $\mu$ M más 5% DMSO (abajo) a 298K.

En la **figura 4.2.1.24** se muestran dos espectros monodimensionales  $^1\text{H}$  para el mismo tetrasacárido, el **9**. Las muestras para la realización de los espectros fueron preparados con un 5% de DMSO en ambos caso y el mismo buffer. La diferencia entre ambos es la concentración del tetrasacárido. El de arriba presenta una concentración de 1 mM y el de abajo 230  $\mu$ M. Claramente se observa una gran diferencia en los dos espectros.



**Figura 4.2.1.24** Espectros monodimensionales obtenidos para el tetrasacárido **9** a la misma temperatura pero diferente concentración. El espectro superior se realizó a 1.5 mM y el inferior a 230  $\mu$ M.

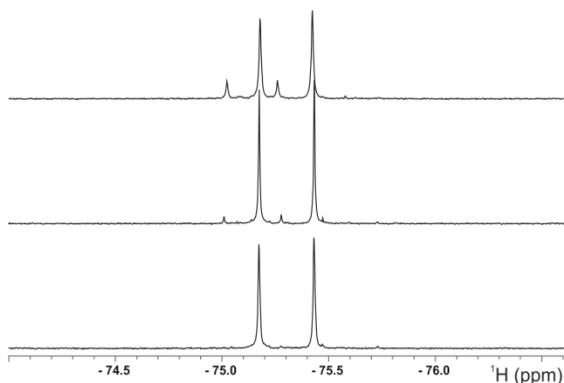
Además de la influencia en la muestra de la concentración y del disolvente, también se produce una disminución de la agregación con la temperatura. En la **figura 4.2.1.25** se muestran los espectros monodimensionales obtenidos a diferentes temperaturas con la misma concentración de ligando 1.5 mM. Se observa que el espectro superior a 298K presenta más agregación que el central a 303K y más que el inferior a 313K.



**Figura 4.2.1.25** Espectros monodimensionales obtenidos a 1 mM de tetrasacárido **9** a 298K (arriba), a 303K (el del centro) y a 313K (el de abajo).

Se decidió hacer experimentos  $^9\text{F}$ -RMN ya que este tetrasacárido presentaba los átomos de Flúor. Los tres espectros de Flúor obtenidos para la misma muestra se representan en la **figura 4.2.1.26**. El espectro inferior obtenido con la muestra recién preparada se observan las dos señales de los átomos de Flúor presentes en el tetrasacárido. El espectro central se obtuvo a las 24 horas de la preparación de la muestra y aparecen dos

señales muy pequeñas indicando que algún tipo de degradación está ocurriendo en la muestra. A los 20 días se realizó el mismo experimento y con la misma muestra obteniendo el espectro superior donde las dos señales pequeñas aumentan. Esto sugiere que la muestra se degrada con el paso del tiempo.



**Figura 4.2.1.26** Espectros  $^1\text{F}$ -RMN obtenidos a 0 días, 1 día y 20 días de la preparación de la muestra.

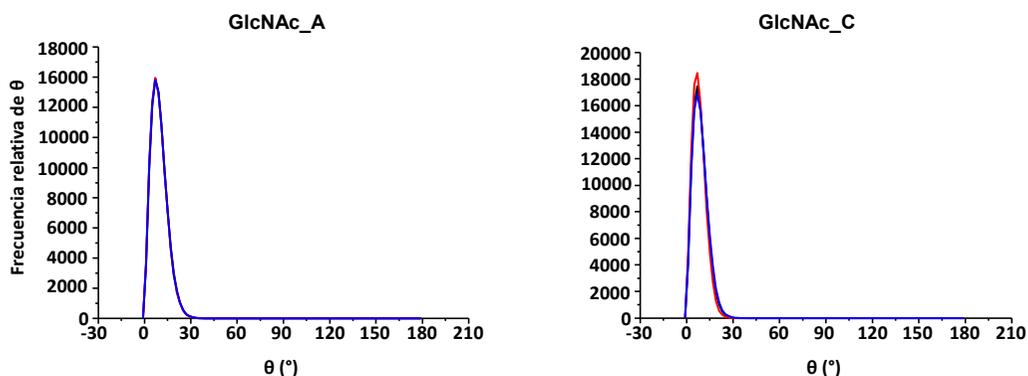
Para obtener datos cuantitativos de la estructura tridimensional del tetrasacárido **9** se midieron las constantes de acoplamiento (**tabla 4.2.1.20**) y tal y como se observa las constantes medidas fueron muy escasas.

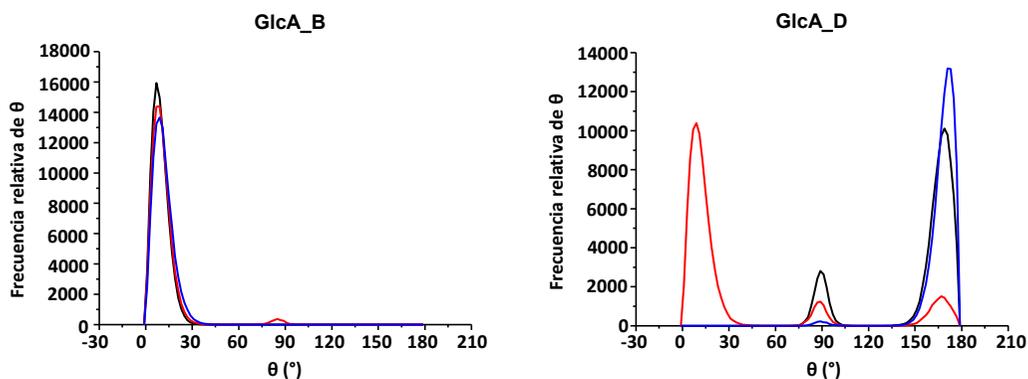
Pareja de átomos	$^3J_{\text{HH}}$ experimental	Pareja de átomos	$^3J_{\text{HH}}$ experimental
H1A/H2A		H1C/H2C	8.2
H2A/H3A		H2C/H3C	
H3A/H4A		H3C/H4C	
H4A/H5A		H4C/H5C	
H1B/H2B	8.1	H1D/H2D	8.2
H2B/H3B	8.1	H2D/H3D	8.2
H3B/H4B	8.3	H3D/H4D	
H4B/H5B	8.3	H4D/H5D	9.8

**Tabla 4.2.1.20** Constantes de acoplamiento experimentales y teóricas (medidas de la DM con y sin restricciones) para el tetrasacárido **8** a 298K y a 600 MHz.

Para el tetrasacárido **6** el procedimiento utilizado para la disolución de la muestra fue el mismo. Como era de esperarse, se formaba un agregado que persistía incluso al disolver la muestra e impedía la realización del análisis cuantitativo de dicho tetrasacárido pudiendo medir muy pocas constantes de acoplamiento.

Para el tetrasacárido **9** se llevaron a cabo tres dinámicas moleculares sin restricciones de 50 ns cada una haciendo un total de 150 ns. Las dinámicas fueron lanzadas consecutivamente de tal forma que las coordenadas obtenidas de una dinámica era el input de coordenadas para la siguiente dinámica. Se decidió hacer así ya que cuando se lanzaba una dinámica de 500 ns como las demás, al presentar tantos grupos protectores aromáticos, el coste computacional aumentaba al doble. Las representaciones de las coordenadas de plegamiento theta para las tres dinámicas (cada línea de un color) y para los cuatro anillos se representan en la **figura 4.2.1.25**. La línea roja representa las coordenadas de los primeros 50 ns de la dinámica, la verde representa los segundos 50 ns y la azul representa los últimos 50 ns. Se puede observar que para los tres anillos A, B y C las coordenadas son de una conformación  ${}^4C_1$ , sin embargo para el anillo D representado en última posición en la **figura 4.2.1.25** se observa que hay un cambio en las conformaciones ya que theta varía desde 0 a 180° pasándose y manteniéndose en 90°. Obviamente, es previsible esperar un equilibrio conformacional según la dinámica libre a que el GlcA se encuentra en un extremo y presenta tres grupos hidrofóbicos en las posiciones 2, 3 y 5. Como mínimo existen tres conformaciones  ${}^4C_1$ ,  ${}^1C_4$  y la que predomina cuando theta está en el ecuador. Para saber dicha conformaciones hay que fijarse en la coordenada phi representada en la figura xxx. (Hacerla pero no me gusta ya que ocupa mucho y se no ve bien los símbolos. Coger frames alternados.).





**Figura 4.2.1.27** Representación de las coordenadas de Cremer-Pople (theta) para los 4 anillos del tetrasacárido **9** de las tres dinámicas de 50 ns realizadas.

Del tetrasacárido **9** no se pudieron medir distancias experimentales entre los hidrógenos debido al solapamiento. Se intentaron medir las  $^3J_{HH}$  con un resultado algo mejor pero obviamente para los anillos de GlcA no coincidían con las dinámicas libres lanzadas por lo que se llevó a cabo una dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo. Para ello se usó como restricciones las distancias H1-H5 y H3-H5 para el anillo D que era es que presentaba un equilibrio conformacional. Estas distancias obviamente fueron distancias medidas teóricamente 2.6 Å para las dos. Se puede observar que para los anillos de GalNAc no hay muchas  $^3J_{HH}$  medidas pero sí hay algunas más para los anillos GlcA. Para el anillo B, tanto las constantes experimentales como teóricas (con y sin restricciones) son constantes grandes indicativas de una conformación  $^4C_1$ . Sin embargo para el anillo D las constantes obtenidas de la dinámica con restricciones sí coinciden con las experimentales indicando que la conformación teórica y experimentales es  $^4C_1$  mientras que los valores no coinciden con los acoplamientos teóricos de la dinámica libre.

	$^3J_{HH}$ experimental	$^3J_{HH}$ dinámica libre	$^3J_{HH}$ dinámica restricciones
H1A/H2A		8.2	8.2
H2A/H3A		10.3	10.3
H3A/H4A		3.0	3.0
H4A/H5A		1.0	1.0
H1B/H2B	8.1	7.8	7.8
H2B/H3B	8.1	8.8	8.9
H3B/H4B	8.3	8.5	8.9

H4B/H5B	8.3	10.0	10.1
H1C/H2C	8.2	8.3	8.3
H2C/H3C		10.5	10.4
H3C/H4C		3.0	3.4
H4C/H5C		1.3	1.5
H1D/H2D	8.2	3.2	7.5
H2D/H3D	8.2	4.2	9.0
H3D/H4D		4.6	8.7
H4D/H5D	9.8	3.7	9.9

**Tabla 4.2.1.21** Constantes de acoplamiento H-H experimentales para el tetrasacárido **9** medidas a 298K.

#### 4.2.2 Estudio del complejo Midkina-tetrasacárido mediante RMN y docking.

Esta parte del capítulo está enfocada en el estudio de los complejos formados entre la Midkina y los diferentes tetrasacáridos cuyos resultados obtenidos acerca de la estructura tridimensional se han expuesto anteriormente. Además, se han incorporado a este estudio los complejos formados con la misma proteína pero con tetrasacáridos cuya estructura tridimensional libre fue estudiada anteriormente en el grupo<sup>10</sup>.

La primera parte de esta sección está enfocada en el estudio de los complejos formados por la Midkina y los tetrasacáridos no protegidos (tetrasacárido **1**, **7** y **10**). Además de la estructura del complejo se determinará la influencia del grado de sulfatación en la interacción proteína-ligando ya que los resultados obtenidos para el tetrasacárido **1** podrá ser comparados con el tetrasacárido **3** ya estudiado en el grupo y los resultados de los tetrasacáridos **7** y **10** también podrán ser comparados entre ellos ya que presentan la misma secuencia pero difieren en el grado de sulfatación.

La segunda parte está basada en el estudio de los complejos proteína-ligando formados por la Midkina y los tetrasacáridos dibencilados (tetrasacáridos **2**, **5** y **8**). Después de conocer las posibles estructuras del complejo y las bases moleculares de la interacción de la Midkina con los tetrasacáridos dibencilados se estudiará cómo afectará la presencia de dos grupos hidrofóbicos en dicha interacción.

Por último, se estudiarán los complejos formados por la Midkina y el tetrasacárido persustituido (compuesto **9**) y se determinará la influencia de los grupos hidrofóbicos en la interacción proteína-ligando.

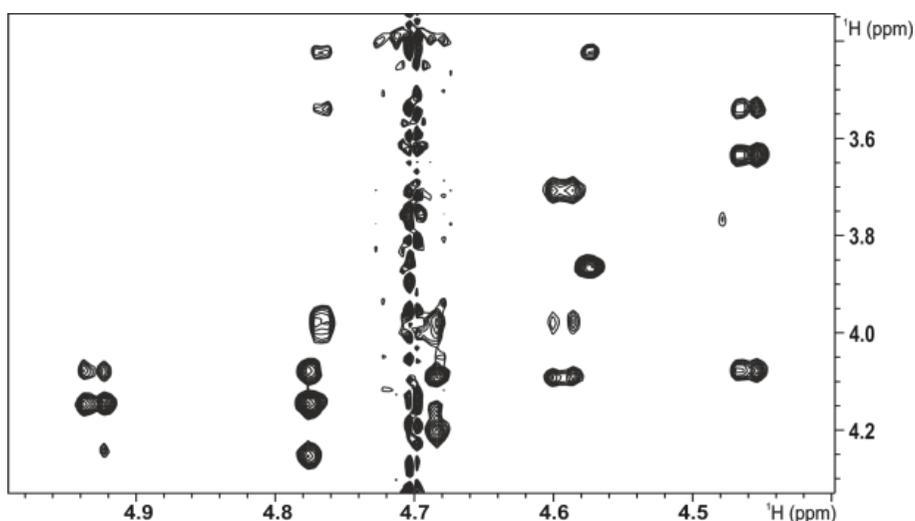
El estudio de todos los complejos se llevó a cabo mediante técnicas de RMN como  $^1\text{H}$ -STD y NOESY transferido a 298K y 600 MHz y técnicas teóricas como docking. Las condiciones de las diferentes muestras fueron 1 mM de tetrasacárido y 20  $\mu\text{M}$  de proteína en 250  $\mu\text{L}$  de buffer 1 x PBS. Si se necesitase un cambio en las condiciones de los experimentos o de la muestra se especificará en el apartado correspondiente.

#### **4.2.2.1** *Estudio de la interacción entre la Midkina y tetrasacáridos no protegidos (tetrasacáridos 1, 7 y 10).*

##### ➤ **Tetrasacárido 1.**

En primer lugar, se mostrarán los resultados obtenidos para el complejo formado por el tetrasacárido **1** y la Midkina. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de NOESY transferido y STD a 298K. Con ambos experimentos además de conocer si se produce interacción entre la proteína y el ligando también proporcionan información acerca de la estructura del tetrasacárido en su forma enlazada y del porcentaje de saturación que le llega al ligando desde la proteína indicando el modo de unión de ambos compuestos (para más detalle ver metodología).

El espectro NOESY obtenido a un tiempo de mezcla de 200 ms con 8 escanes de 512 fides y 4096 puntos cada fid se representa en la **figura 4.2.2.1**. En ella, se muestran los picos NOEs del ligando enlazado que están rotulados. Se observan los mismos picos NOEs que los obtenidos cuando el ligando se encuentra en su forma libre indicando que la estructura no varía a causa de la interacción con el receptor. Sin embargo, las velocidades de crecimiento de los picos son ahora mayores y compatibles con un complejo de mayor tamaño. Esta estructura sigue siendo lineal y con conformación  $^4\text{C}_1$  para los anillos de GlcA y GalNAc y  $^2\text{S}_0$  para el IdoA. Además, se realizaron los mismos experimentos a diferentes tiempos de mezcla pudiendo medir las distancias experimentales representadas en la **tabla 4.2.2.1**. Los tiempos de mezcla fueron: 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 y 1s. Todas ellas reflejan la misma conformación del ligando libre.



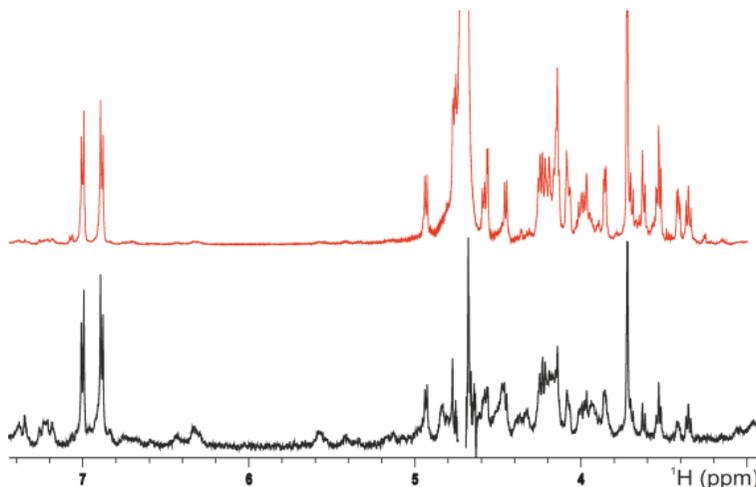
**Figura 4.2.2.1** Espectro NOESY transferido a 200 ms y 298K. Muestra la conformación del ligando enlazado del tetrasacárido **1**.

Pareja de átomos	Distancias experimentales	Distancias experimentales	Distancias experimentales
H3A/H1A	2.6 Å	H3C/H1C	2.6 Å
H5A/H1A	2.2 Å	H5C/H1C	2.6 Å
H3B/H1B	2.6 Å	H4B/H1C	2.3 Å
H5B/H1B	2.5 Å	H3D/H1D	2.4 Å
H3A/H1B	2.9 Å	H2D/H5D	2.7 Å
		H4D/H5D	2.4 Å
		H2D/H1D	2.5 Å
		H3C/H1D	2.2 Å

**Tabla 4.2.2.1** Distancias experimentales del tetrasacárido **1** enlazado, obtenidas a partir de la curva de crecimiento del NOE a 298K por el método de las velocidades iniciales.

En la **figura 4.2.2.2** se muestra el espectro  $^1\text{H}$ -STD (negro) y el  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) para el tetrasacárido que se está estudiando. Tal y como se esperaba se produce interacción entre la proteína y el ligando. Además, en el espectro  $^1\text{H}$ -STD se observa que a todos los protones en mayor o menor medida le llega saturación de la proteína indicando un modo de interacción lineal entre la proteína y el ligando. Es decir, no hay segmentos, ni caras, ni residuos con una interacción preferente con la Midkina. El modo de unión sería similar al descrito por RMN y observado para los tetrasacáridos **3** y **4**. En este caso, el tetrasacárido se sitúan entre los dos dominios que contiene la Midkina, que se

encontraría en una conformación plegada, y la región hinge con los que también establece contacto, pero sin una orientación definida.



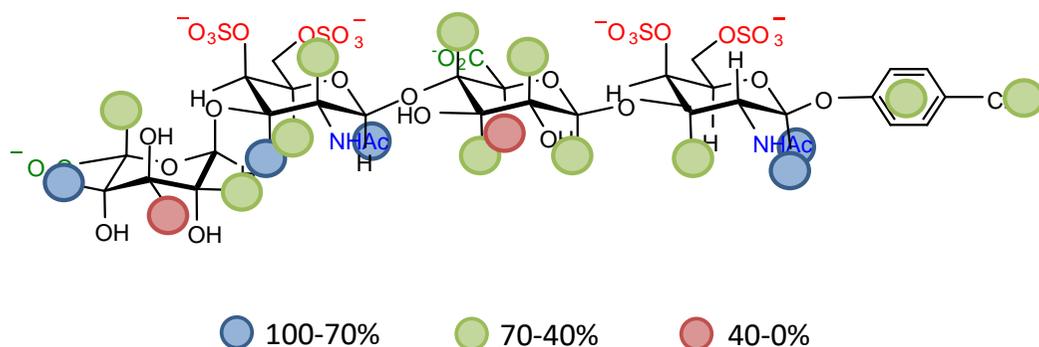
**Figura 4.2.2.2** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) y espectro STD (negro) a un tiempo de saturación de 4 s.

Para realizar un análisis más cuantitativo se han medido los valores de  $\text{STD}_0$  tanto absolutos y como relativos para los protones que no están solapados (**tabla 4.2.2.2**). Se puede observar que el 100% de saturación con un valor de  $\text{STD}_0$  absoluto de 4,3% le corresponde a uno de los protones del anillo D, llegándole más saturación que al anillo aromático presente en el tetrasacárido **1** (prácticamente la mitad). Este hecho pone de manifiesto la menor influencia en el enlace del grupo OMP con respecto a los demás hidrógenos. Además, los valores de  $\text{STD}_0$  absolutos varían de un 2-4.3% por lo que el rango de saturación es pequeño no pudiéndose obtener más conclusiones.

Nombre	STD0 rel./abs.	Nombre	STD0 rel./abs.
H1A	93.6/4.0	H2C	62.2/2.7
H3A	49.1/2.1	H3C	94.5/4.1
H1B	60.9/2.6	H5C	48.7/2.1
H2B	60.4/2.6	H2D	47.1/2.0
H3B	60.3/2.6	H3D	38.0/1.6
H4B	58.6/2.5	H4D	100/4.3
H5B	37.6/1.6	H5D	62.8/2.7
Ac	81.5/3.5	CH <sub>3</sub> -OMP	55.3/2.4
Ph-OMP	48.6/2.1		

**Tabla 4.2.2.2** Valores de  $STD_0$  absolutos y relativos obtenidos para el tetrasacárido **1** de 0.5 a 4 s de tiempo de saturación a 298K.

Para determinar la orientación que toma el ligando al interactuar con la proteína se determinó el mapa del epítipo (**figura 4.2.2.3**). Este refleja la ausencia de una zona privilegiada con una mayor interacción que el resto, que se distinguiera por STD más altos o, por el contrario, zonas que tuviesen menos responsabilidad en la interacción. Por lo tanto, se puede deducir una interacción similar a la descrita consistente con un modo de unión lineal del ligando en el centro activo de la Midkina en una conformación plegada.

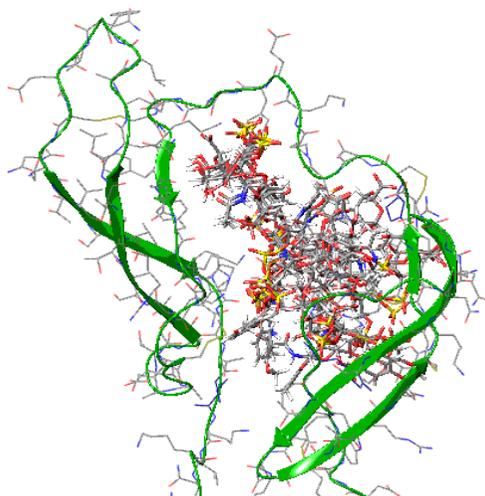


**Figura 4.2.2.3** Representación del mapa de epítipo para el tetrasacárido **1** obtenido de los valores de  $STD_0$  medidos a 298K.

Si se comparan los resultados obtenidos del análisis de RMN para los tetrasacáridos **1** y **3** (de la misma secuencia pero con diferencia en el patrón de sulfatación) se puede indicar que ambos se comportan de forma similar cuando se unen a la proteína ya que los valores de STD ligeramente superiores mostrados para el tetrasacárido **1** no son indicativos de una mayor interacción. Por lo tanto, para esta pareja de tetrasacáridos no se puede diferenciar un modo de unión diferente debido al aumento de grupos sulfato, sin embargo, los valores de  $IC_{50}$  si muestran una gran diferencia para ambos tetrasacáridos indicando mayor interacción para el tetrasacárido **3** con mayor grupos sulfato, como era de esperarse.

Para obtener una estructura teórica del complejo y complementar los resultados experimentales se realizó un docking para el tetrasacárido **1** mediante el módulo de Glide. Para ello se utilizó el modelo 3 de la estructura de la MDK. El Grid empleado para la realización del docking fue de 30 Å desde el centro de la proteína ocupando toda la superficie del sitio activo de ella. Las demás condiciones de este estudio se pueden

ver en la parte experimental. El docking SP es un docking simple que se basa en las interacciones electrostáticas para la determinación de la estructura del complejo. En la **figura 4.2.2.4** se observa que con un grid grande el ligando se queda entre los dos dominios de la proteína. Se muestran las 11 estructuras de menor energía obtenidas para el complejo y claramente se puede observar diferentes modos de unión pero todos pueden confirmar los datos experimentales obtenidos mediante STD.

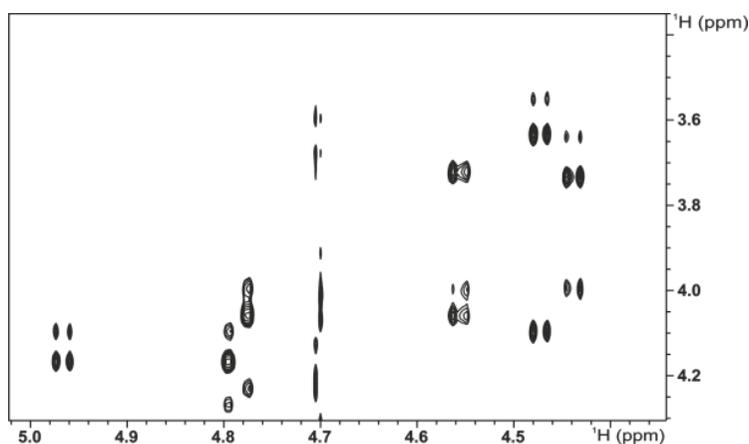


**Figura 4.2.2.4** Estructuras superpuestas para el tetrasacárido **1** obtenidas del docking molecular.

➤ **Tetrasacárido 7.**

El mismo estudio sobre el complejo formado con el tetrasacárido **1** se realizó con el tetrasacárido **7**, el cual presenta una secuencia de CS-E y un sulfato más en el extremo no reductor. Se llevaron a cabo experimentos de NOESY transferido para determinar la estructura del ligando en su forma enlazada a diferentes tiempos de mezcla (s) y experimentos STD para determinar el modo de unión entre ambas especies. Además del docking que permite obtener la estructura del complejo de forma teórica.

En la **figura 4.2.2.5** se muestra el espectro NOESY obtenido a 200 ms y 298K. Los NOEs significativos para la determinación de la estructura se denotan en el espectro bidimensional. Dichos NOEs son indicativos de una estructura lineal cuyas conformaciones para los cuatro anillos es de  ${}^4C_1$  no encontrándose diferencias en los NOEs que reflejen una estructura del ligando enlazado diferente a la del libre.



**Figura 4.2.2.5** Espectro tr-NOESY a 200 ms a 298K. Muestra la conformación del ligando enlazado del tetrasacárido 7.

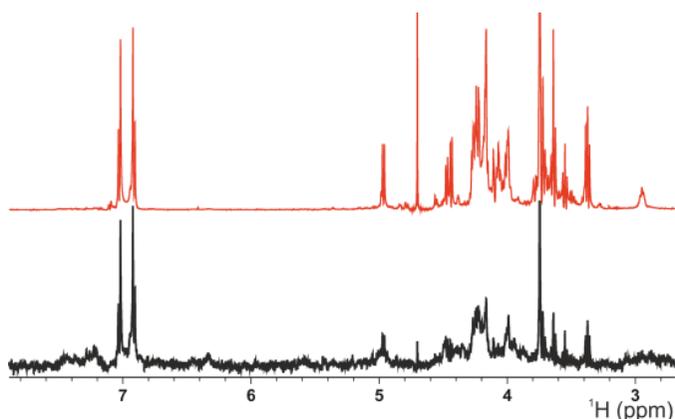
Además de los espectros, en la **tabla 4.2.2.3** se recogen las distancias experimentales obtenidas a partir de la curva de crecimiento del NOE para el ligando cuando forma parte del complejo. Respecto a la disposición de los enlaces glicosídicos las distancias deducidas mediante NOE para el enlace entre el anillo C y D es más larga de lo esperado ya que es mayor que cuando el ligando se encuentra en su forma libre. Además, la distancia H1D/H5D muestra una longitud ligeramente mayor que el resto, lo que podría indicar una cierta distorsión o mayor flexibilidad en esta región.

Pareja de átomos	Distancia experimental	Pareja de átomos	Distancia experimental
H3A/H1A	2.6 Å	H3C/H1C	2.6 Å
H5A/H1A	2.8 Å	H5C/H1C	2.7 Å
H3B/H1B	2.6 Å	H4B/H1C	2.8 Å
H5B/H1B	2.9 Å	H3D/H1D	2.6 Å
H3A/H1B	2.8 Å	H5D/H1D	3.2 Å
		H3C/H1D	3.0 Å

**Tabla 4.2.2.3** Distancias experimentales del ligando enlazado (tetrasacárido 7).

El espectro de STD y  $^1\text{H}$ -RMN se representan en la **figura 4.2.2.6** en el cual se observa que se produce interacción entre el tetrasacárido 7 y la Midkina. Además, se observa un gran solapamiento entre señales no estando las señales del ligando bien definidas

apareciendo en el STD significativamente ensanchadas. Esto es probablemente un efecto cinético, al aumentar la estabilidad del complejo, la velocidad de disociación no es lo suficientemente rápida como para permitir que una cantidad suficiente de ligando saturado regrese a su estado libre, disminuyendo el valor de STD. Esto indicaría que para la misma relación proteína-ligando que en el caso anterior, 1:50, la interacción es mayor. Para este tetrasacárido las condiciones experimentales no se cambiaron para poder determinar diferencias potenciales entre todos los tetrasacáridos.



**Figura 4.2.2.6** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) y espectro STD (negro) a un tiempo de saturación de 4 s.

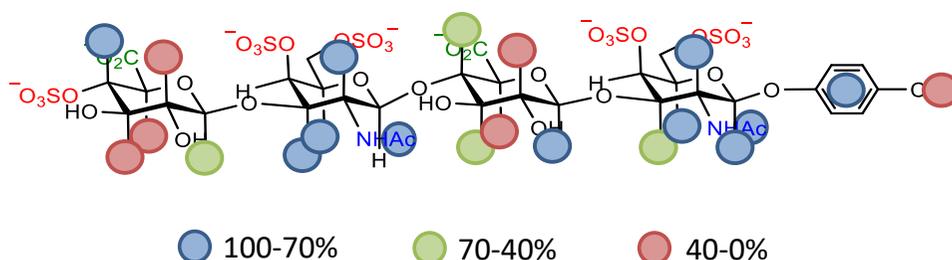
Los valores de  $\text{STD}_0$  absolutos y relativos (**tabla 4.2.2.4**) reflejan un valor de 100% de  $\text{STD}_0$  relativo correspondiente a uno de los protones del anillo C más que para el grupo aromático del extremo reductor.

Nombre	$\text{STD}_0$ rel./abs.	Nombre	$\text{STD}_0$ rel./abs.
H1A	70.9/0.85	H2C	91.4/1.10
H2A	77.5/0.93	H3C	<b>100/1.2</b>
H3A	65.5/0.80	H5C	78.9/0.95
H5A	71.1/0.86	H1D	40.1/0.48
H1B	86.7/1.04	H2D	38.5/0.46*
H2B	38.5/0.46*	H3D	38.0/0.46
H3B	46.5/0.56	H4D	86.8/1.04
H4B	47.0/0.57	H5D	39.5/0.47
H5B	35.0/0.42	Ac	83.0/1.00

CH3-OMP	36.5/0.44	Ph-OMP	88.1/1.06
---------	-----------	--------	-----------

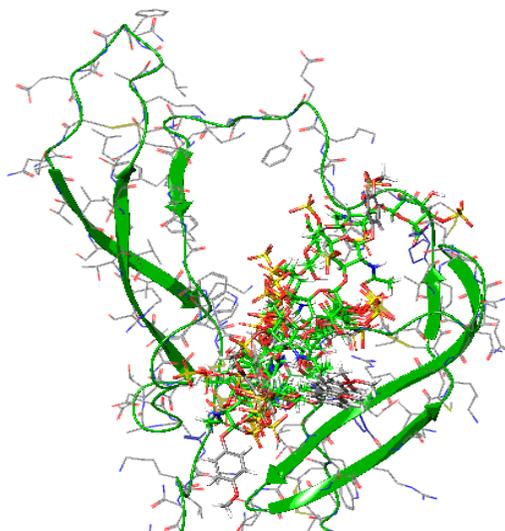
**Tabla 4.2.2.4** Valores de  $STD_0$  absoluto y relativo obtenidos para el tetrasacárido **7** obtenidos mediante el análisis de la curva de crecimiento del STD de 0.5 a 4 s de tiempo de saturación.

Si se observa la **figura 4.2.2.7** la cual representa el mapa de epítipo podemos deducir que el modo de unión es lineal porque a casi todos los protones le llega saturación de la proteína. Además, la saturación que le llega a los protones de los anillos de GalNAc está en el rango de 70-100% lo que no ocurre para los otros dos anillos. El problema que sólo con estos datos experimentales no podemos llegar a obtener un modo de unión diferente al anterior.



**Figura 4.2.2.7** Mapa del epítipo del tetrasacárido **7** obtenido a partir de la curva de crecimiento del porcentaje de STD.

Las estructuras del docking obtenidas con el mismo modelo de la proteína y las mismas condiciones que en el caso anterior se muestran en la **figura 4.2.2.8**. La zona donde se orienta el ligando es entre los dos dominios de la proteína y las 11 estructuras de menor energía se orientan de forma diferente indicando más de un modo de unión sin poder precisar una estructura definida del complejo.



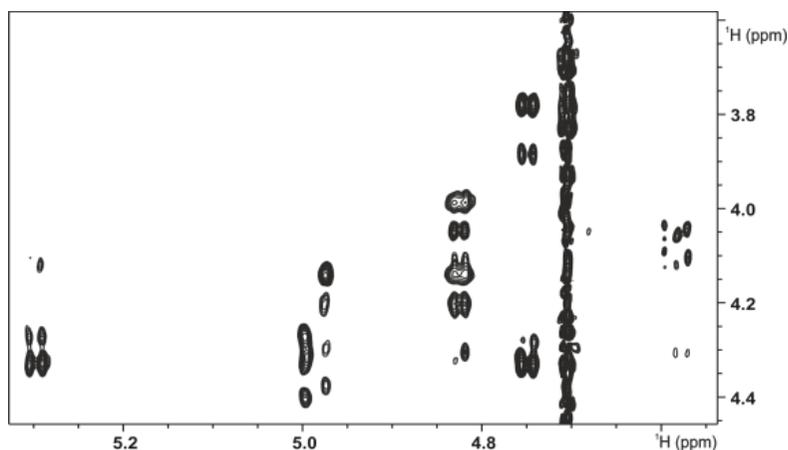
**Figura 4.2.2.8** Representación del complejo formado con el tetrasacárido **7** obtenido mediante docking.

➤ ***Tetrasacárido 10.***

El último de los tetrasacárido no protegidos que se va a estudiar en esta tesis doctoral es el tetrasacárido **10**. Este presenta una secuencia de CS tipo T con un grupo sulfato más en posición 4 del extremo no reductor. Por lo tanto, de los tres tetrasacáridos no protegidos estudiados, éste es el que más grupos sulfato presenta siendo lógico pensar que al su número aumente la interacción proteína ligando por el aumento de las interacciones electrostáticas que se puedan producir entre la proteína y el ligando.

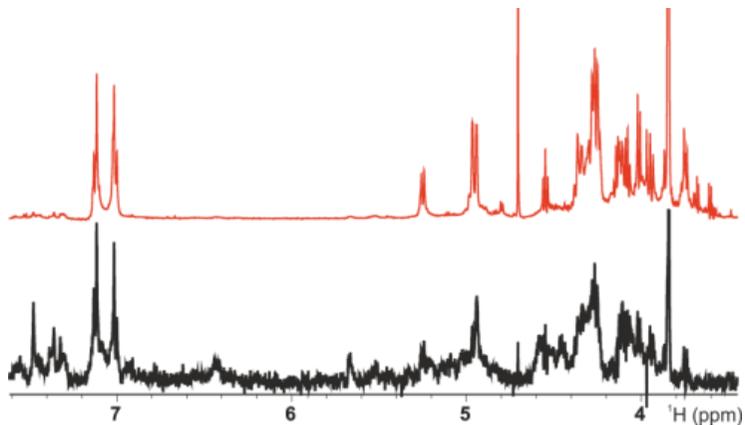
Por ello, se realizaron experimentos de STD y NOESY transferido. En este caso no se midieron distancias experimentales del ligando complejado simplemente se hizo un NOESY transferido a temperatura alta con la relación 1:50 y un tiempo de mezcla 300 ms.

El experimento NOESY transferido se llevó a cabo a 317K encontrando picos NOEs indicativos de que las conformaciones del ligando complejado para los cuatro anillos son las mismas que las del ligando libre ( ${}^4C_1$ ) (**figura 4.2.2.9**) y, por otro lado, la estructura es mantiene lineal. Al aumentar la temperatura se aumenta la cinética del equilibrio del complejo-ligando libre.



**Figura 4.2.2.9** Espectro NOESY transferido obtenido a 300 ms y a 317K para el tetrasacárido **10**.

En este caso, a 317K, se observan STD (**figura 4.2.2.10**) en todos los protones y no se muestra evidencias de que a ningún protón no le llegue saturación por lo que se puede asegurar que la interacción proteína-ligando es lineal. El espectro de diferencia (negro) muestra un gran solapamiento de señales indicativo de la formación del complejo entre la proteína y el ligando.



**Figura 4.2.2.10** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) y STD (negro) obtenido a 313K y a 4 s para el tetrasacárido **10**.

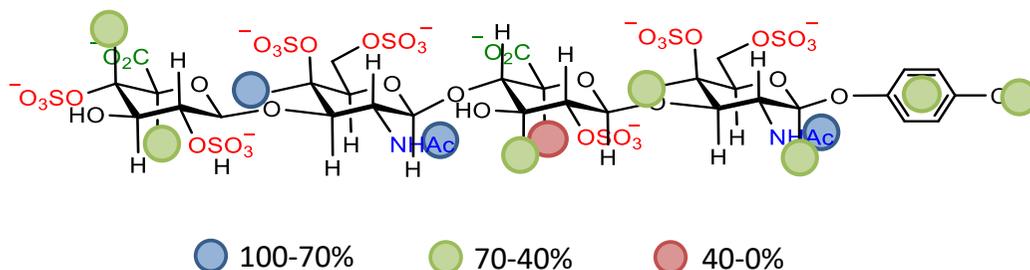
Como era de esperar, los valores de  $\text{STD}_0$  presentan un bajo valor incluso a temperatura alta. El cambio de temperatura se hizo con la esperanza de que al favorecer la cinética del equilibrio y al mismo tiempo aumentar la población del ligando libre, se aumentarían los valores de STD. Este valor tan bajo no se debe a que no haya interacción sino a que la cinética es desfavorable al aumentar la interacción es muy fuerte debido a la gran

cantidad de grupos sulfato. Los valores de  $STD_0$  relativo indican que el 100% de STD es en este caso para los grupos acetilos del anillo de los anillos de GalNAc. Mientras que en los dos tetrasacáridos **1** y **7** el máximo de interacción ocurría en los anillos C y D.

Nombre	$STD_0$ rel./abs.	Nombre	$STD_0$ rel./abs.
H1A	67.0/1.5	H4C	98.1/2.18
H4A	59.9/1.3	H4D	67.9/1.5
H3B	37.4/0.8	H5D	66.9/1.5
H5B	0.6/2.5	Ac	100/2.7
CH3-OMP	55.9/1.2	Ph-OMP	59.5/1.3

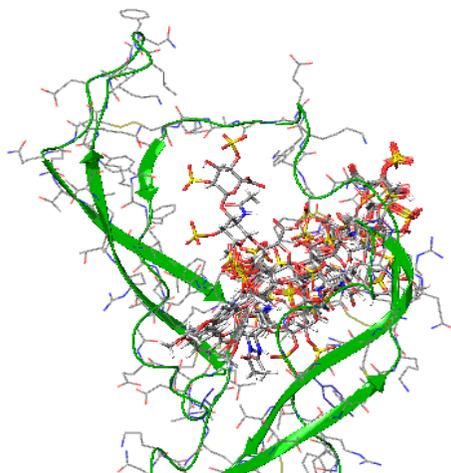
**Tabla 4.2.2.5** Representación de los valores de  $STD_0$  relativos y absolutos para el tetrasacárido **10** medidos a 317 K y 4 s de saturación.

El mapa de epítipo de este tetrasacárido se representa en la **figura 4.2.2.11**. En él se puede observar como como a los dos grupos acetilos y al H4C le llega más saturación que a los demás indicando posición en la Midkina en el centro de la proteína entre los dos dominios, sin poder distinguir un modo de unión diferente al de los demás compuestos.



**Figura 4.2.2.11** Mapa del epítipo obtenido para el tetrasacárido **10** obtenido a 313K.

La estructura de los complejos obtenidos mediante un docking SP se muestra en la **figura 4.2.2.12**. En ella se observan diferentes modos de unión como ocurre para los demás tetrasacáridos no protegidos sin poder definir un modo de unión del complejo único.



**Figura 4.2.2.12** Estructura representativa del complejo para el tetrasacárido **10** obtenida mediante docking.

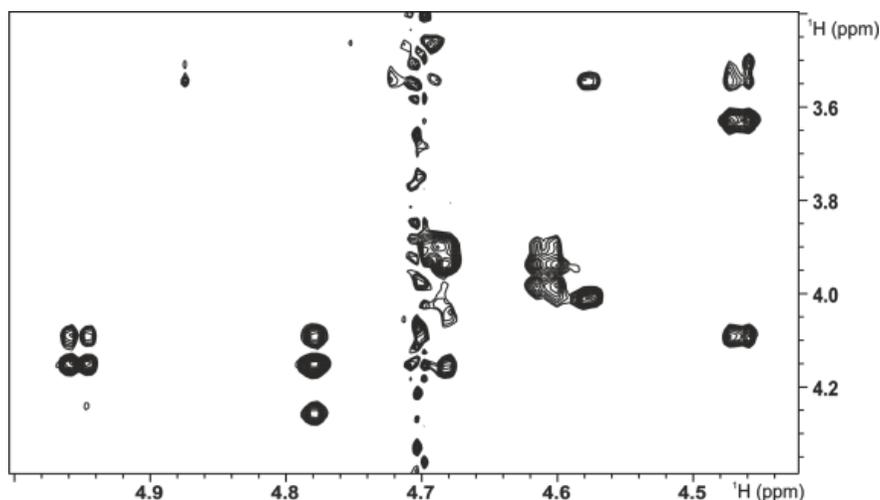
Como se ha explicado para los tres tetrasacáridos anteriores, la conformación de los anillos de los ligandos complejados no varían predominando la conformación  ${}^4C_1$  para todos los anillos excepto para el IdoA que se detecta su conformación típica  ${}^2S_0$ . Tampoco varía apreciablemente los ángulos interglicosídicos. Por lo tanto, estas conformaciones y la forma lineal de las estructuras coinciden con la de los ligandos libres y mediante las conclusiones de RMN de los complejos se descartan cambios en la estructura del ligando enlazado por efecto de la interacción. Por las estructuras de docking y los mapas del epítipo obtenido para cada complejo se puede indicar que el sitio de unión entre la proteína y el ligando es prácticamente el mismo situándose el ligando entre los dos dominios de la proteína independientemente del número de grupos sulfato. Y como muestran las estructuras obtenidas de los docking para los tres tetrasacáridos la mayor interacción se debe a la presencia de grupos sulfato debido a que aumentan los grupos de interacción electrostática con la Midkina pero no se debe a un cambio de conformación a un modo de unión diferente ya que no se ha podido distinguir un modo de unión único para los tetrasacáridos. Se puede suponer que la Midkina que en este caso es mucho más flexible que los tetrasacáridos se une a ellos plegándose la proteína alrededor del oligosacárido lineal.

#### 4.2.2.2 *Estudio de la interacción entre la Midkina y tetrasacáridos dibencilados (2, 5 y 8).*

De las tres series con diferente secuencia se han estudiado los productos intermedios **2**, **5** y **8** que presentan un grupo bencilo en posición 3 de cada residuo de ácido urónico. Ya se conocía que la zona de interacción de los tetrasacáridos con la Midkina estaba formada por aminoácidos hidrofóbicos lo que sugería que ellos podrían influir en la interacción. Este hecho se corroboró con la medida de las constantes de afinidad mediante polarización de fluorescencia realizadas por el grupo de investigación y que concluían que la presencia de sustituyentes aromáticos en los hidroxilos de los tetrasacáridos aumentaba la interacción (ver apartado 4.2.3). Para determinar el posible papel jugado por los sustituyentes aromáticos en la estabilización de los complejos se llevó a cabo el mismo estudio que para los complejos no protegidos. Primero, se determinó la estructura del ligando enlazado empleando las distancias diagnósticas de la conformación obtenidas mediante NOE transferido y, a continuación, mediante experimentos de STD a diferentes tiempos de saturación se analizó la estructura tridimensional del complejo. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 298K. Sin embargo, como en el caso anterior no se pudieron obtener buenos valores de STD0, eran demasiado bajos por exceso de interacción, en este caso se decidió cambiar la relación proteína-ligando para optimizar los resultados de los STD en función de la interacción. Por ello, no fue posible establecer relaciones cuantitativas de afinidad entre los distintos complejos.

##### ➤ *Tetrasacárido 2.*

En la **figura 4.2.2.13** se muestra el espectro bidimensional NOESY obtenido para el tetrasacárido **2**. En este caso, la conformación del ligando enlazado es cualitativamente igual que la correspondiente al ligando libre deducida en el apartado anterior.



**Figura 4.2.2.13** Espectro bidimensional NOESY transferido obtenido para el tetrasacárido **2** a 298 K y 200 ms.

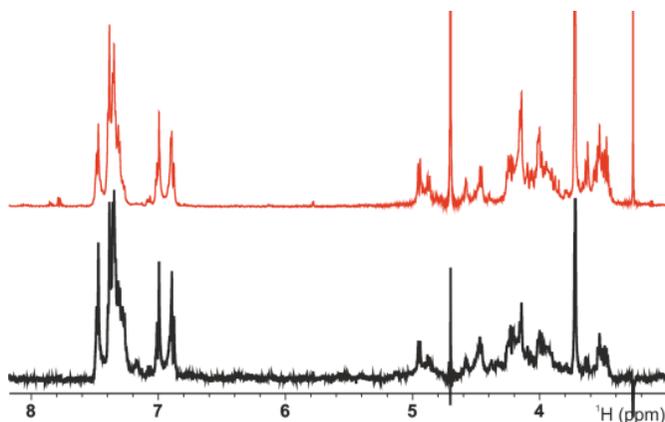
Se midieron las distancias entre los protones posibles para el mismo tetrasacárido mostradas en la **tabla 4.2.2.6** a partir del experimento NOESY transferido.

Pareja de átomos	Distancia experimental	Pareja de átomos	Distancia experimental
H3A/H1A	2.60	H2D/H5D	2.91
H5A/H1A	2.34	H4D/H5D	2.40
H3B/H1B	2.60		
H5B/H1B	2.31		
H3A/H1B	2.59		

**Tabla 4.2.2.6** Distancias experimentales obtenidas para el tetrasacárido **2** medidas a partir de los experimento NOESY transferido a 298K.

Los experimentos de STD realizados para conocer el porcentaje de saturación recibido por el ligando se realizaron, primero, con la misma proporción proteína-ligando que para los demás tetrasacáridos no protegidos. Debido al poco porcentaje de saturación obtenido y a que este complejo presenta un porcentaje de inhibición menor que los demás tetrasacáridos (ver apartado 4.2.3) se repitieron los experimentos a una proporción diferente. En este caso, se disminuyó la concentración de ligando para favorecer la formación del complejo siendo la relación utilizada de 1:25. El espectro obtenido a 4 s de saturación se representa en la **figura 4.2.2.14**. El espectro de STD

(negro) muestra que se le llega saturación a prácticamente todos los hidrógenos del tetrasacárido en referencia con el espectro superior. Por eso se puede suponer que el ligando en conformación extendida se une a la Midkina en su forma plegada, situándose en el centro de los dos dominios estructurados.



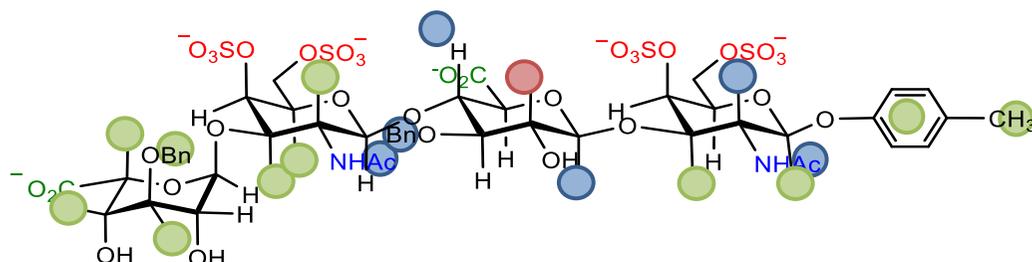
**Figura 4.2.2.14** Espectros monodimensionales de referencia (rojo) y de STD (negro) a 4 s de saturación y 298K para el tetrasacárido **2**.

Se repitió el mismo experimento a diferentes tiempos de saturación para obtener valores de STD y, a partir de la curva de crecimiento del STD obtener los valores a tiempo cero. Dichos valores de STD<sub>0</sub> absolutos y relativos se representan en la **tabla 4.2.2.6**. El 100% de saturación le corresponde a uno de los bencilos situado en el anillo B en el GlcA llegando a los demás anillos aromáticos un 50% de saturación. A pesar de eso, de forma general el tetrasacárido presenta una gran difusión de los valores de STD<sub>0</sub> con casi todos los protones recibiendo cantidades similares de magnetización y sin poder localizar una región privilegiada.

Nombre	STD <sub>0</sub> rel./abs.	Nombre	STD <sub>0</sub> rel./abs.
H1A	66.3/3.2*	H2C	45.8/2.3
H2A	87.6/4.3	H3C	67.8/3.3
H3A	61.2/3.0	H5C	63.6/3.1
H1B	97.2/4.8	H3D	43.8/2.1
H2B	30.2/1.49	H4D	50.6/2.3
H4B	85.0/4.2	H5D	73.9/3.6
Ac	74.5/3.7	BN-1	<b>100/4.9</b>
CH <sub>3</sub> -OMP	71.6/3.5	BN-2	50.9/2.5
		Ph-OMP	55.5/2.7

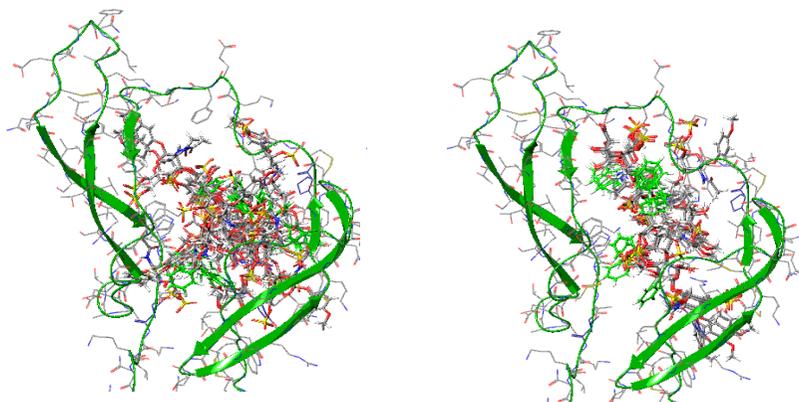
**Tabla 4.2.2.7** Representación de los valores de  $STD_0$  absolutos y relativos a 298K para el tetrasacárido **2**.

El mapa del epítipo para el tetrasacárido **2** (**figura 4.2.1.15**) representa valores desde un 30 a un 100% por lo que no se puede indicar una orientación determinada del ligando en el interior de la proteína.



**Figura 4.2.2.15** Mapa del epítipo para el tetrasacárido **2**.

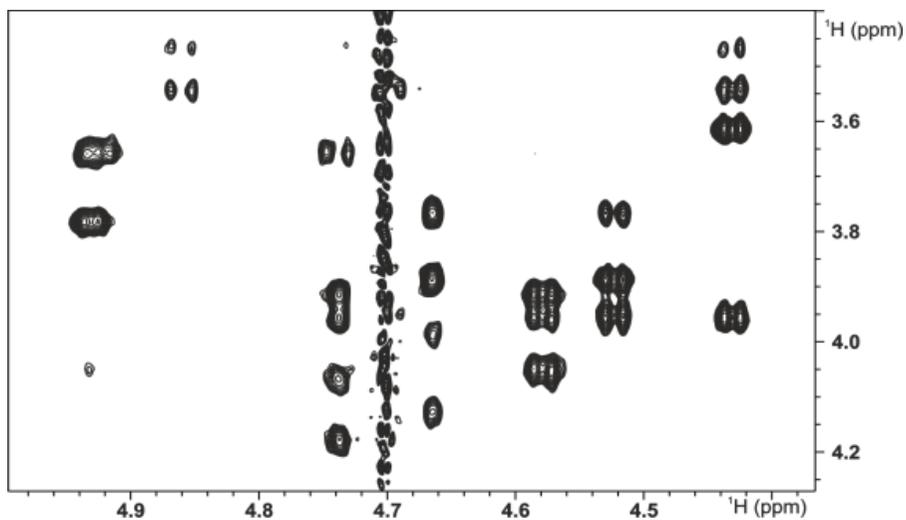
Se realizó un docking para poder elucidar una estructura para el complejo formado con el tetrasacárido **2** (**figura 4.2.2.16**). Las estructuras del complejo de la izquierda son obtenidas a partir de un docking simple cuyas condiciones se muestran en la parte experimental. Para el mismo compuesto se realizó un docking con precisión extra con las estructuras de menor energía obtenidas del docking simple. Según los programadores, este docking es conveniente realizarlo cuando el sistema a estudiar presenta grupos hidrofóbicos ya que tiene en cuenta las interacciones hidrofóbicas junto con las interacciones electrostáticas (complejo de la derecha). Además, esto se llevó a cabo debido a las múltiples orientaciones del ligando que se encuentran en el docking simple. Sin embargo, aunque el complejo obtenido mediante el docking de precisión extra presenta estructuras limitando sus orientaciones, ambos complejos presentan estructuras entre los dos dominios de la proteína no pudiendo identificar un único modo de unión.



**Figura 4.2.2.16** Representación de la estructura del complejo formado entre la Midkina y el tetrasacárido **2** obtenidas a partir de un docking simple (izquierda) y con precisión extra (derecha).

➤ **Tetrasacárido 5.**

El espectro bidimensional NOESY obtenido para el tetrasacárido **5** se muestra en la **figura 4.2.2.17**. Igual que para el tetrasacárido anterior, la conformación del ligando enlazado es cualitativamente igual que la correspondiente al ligando libre.



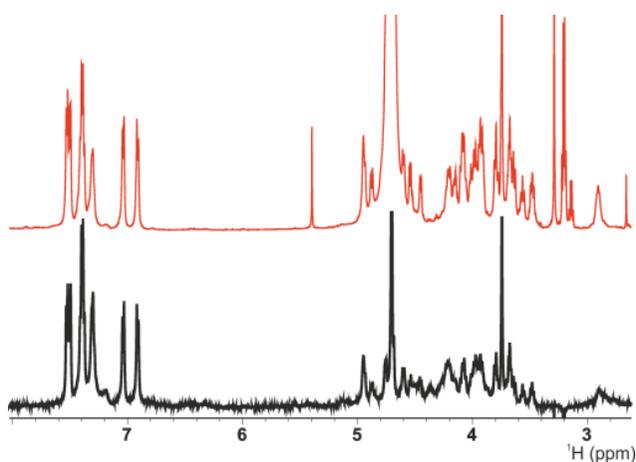
**Figura 4.2.2.17** Espectro bidimensional NOESY transferido obtenido a 200 ms y a 298 K para el tetrasacárido **5**.

Se midieron las distancias a partir de los NOEs experimentales para el tetrasacárido **2** mostradas en la **tabla 4.2.2.8** a partir del experimento NOESY transferido a diferentes tiempos de mezcla.

Pareja de átomos	Distancia experimental	Pareja de átomos	Distancia experimental
H3A/H1A	2.60	H3C/H1C	2.60
H5A/H1A	2.60	H5C/H1C	2.98
H3B/H1B	2.60*	H3B/H1C	2.80
H5B/H1B	2.60*	H3D/H1D	2.60
H4A/H1B	2.86	H5D/H1D	2.93
H3A/H1B	2.10	H4C/H1D	2.78

**Tabla 4.2.2.8** Distancias experimentales obtenidas para el tetrasacárido **7** medidas a partir de los experimentos NOESY transferido a 298K.

Los experimentos de STD se realizaron con una relación 1:50 y con las mismas concentraciones de proteína y ligando que los tetrasacáridos no protegidos. En este caso se midieron valores de STD desde un 2 a un 6% (**tabla 4.2.2.9**) los cuales están de acuerdo para un único sitio de unión proteína-ligando. Así que no se cambió la concentración para el estudio de este complejo. El espectro de STD (negro) muestra que se le llega saturación a prácticamente todos los hidrógenos del tetrasacárido por lo tanto, igual que para el tetrasacárido anterior, se puede suponer que el ligando en conformación extendida se une a la Midkina en su forma plegada, situándose en el centro de los dos dominios estructurados.



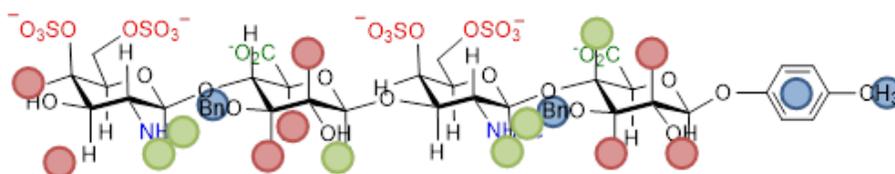
**Figura 4.2.2.18** Representación de los espectros de STD, de referencia (rojo) y de diferencia (negro) a 4 s de saturación para el tetrasacárido **5**.

Nombre	STD <sub>0</sub> rel./abs.	Nombre	STD <sub>0</sub> rel./abs.
H1A	32.5/2.1*	H1C	50.3/3.2
H2A	29.9/1.9*	H2C	33.1/2.1
H3A	29.9/1.9*	H3C	36.7/2.3
H5A	47.7/3.0	H5C	31.1/2.0
H1B	64.1/4.1	H1D	41.7/2.6
CH <sub>2</sub> -BN	32.5/2.1*	H4D	39.5/2.5
Ac	60.0/3.8	BN-1	90.4/5.7*
CH <sub>3</sub> (OMP)	73.5/4.6	BN-2	90.4/5.7*
		Ph (OMP)	<b>100/6.32</b>

\* Valores medidos desde la misma señal debido al solapamiento.

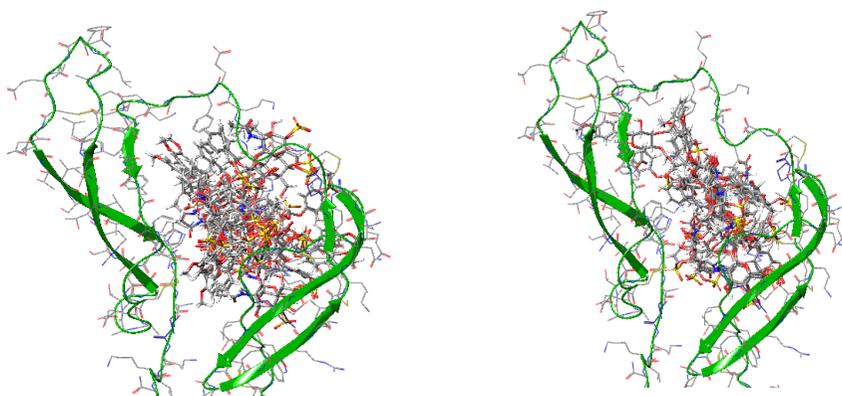
**Tabla 4.2.2.9** Valores de STD<sub>0</sub> absolutos y relativos para el tetrasacárido **5**.

El mapa del epítipo (**figura 4.2.2.19**) representa un rango mucho más amplio de valores que para los demás tetrasacáridos dibencilados posiblemente indicando un modo de asociación diferente. Sin embargo, los valores de STD<sub>0</sub> absolutos están de acuerdo con los demás tetrasacáridos por lo que no se puede afirmar un modo de unión diferente con los datos experimentales actuales.



**Figura 4.2.2.19** Mapa del epítipo para el tetrasacárido **5**.

Igual que para el tetrasacárido anterior, se realizó un docking simple (complejo de la izquierda de la **figura 4.2.2.20**) y un docking con precisión extra (complejo de la derecha) a partir de las estructuras del ligando obtenidas del docking simple. Los resultados son prácticamente similares a los obtenidos para el tetrasacárido dibencilado de la serie A por lo que no se aprecian diferencias estructurales de forma teórica para ambos tetrasacáridos.

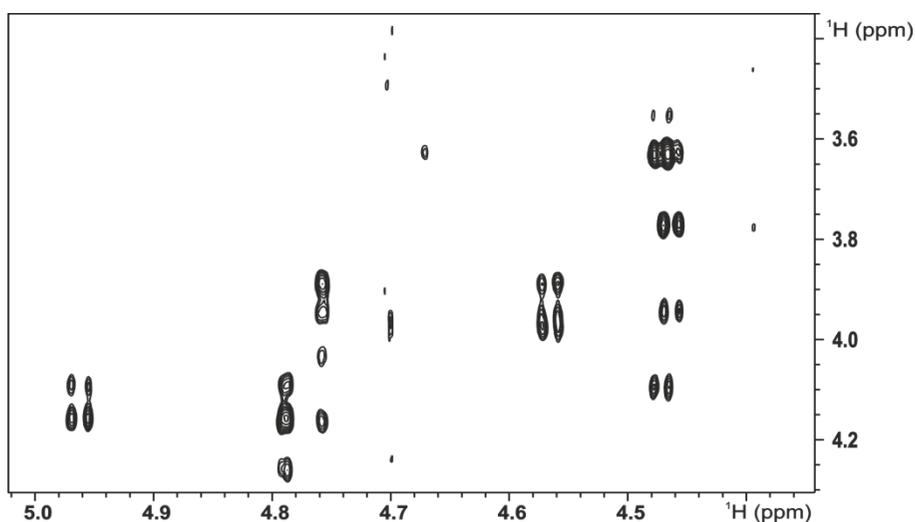


**Figura 4.2.2.20** Representación del complejo formado con la Midkina y el tetrasacárido **5**. La estructura de la izquierda obtenida por un docking simple y la de la derecha por un docking más preciso.

➤ **Tetrasacárido 8.**

Este tetrasacárido es el último a estudiar de esta serie de tetrasacáridos dibencilados. Para él se realizó los mismos experimentos que los mostrados en los tetrasacáridos anteriores.

El espectro NOESY transferido a 200 ms (**figura 4.2.2.21**) el cual muestra la conformación del ligando enlazado muestra la misma conformación para los anillos que el ligando libre, mostrando los mismos picos NOEs.



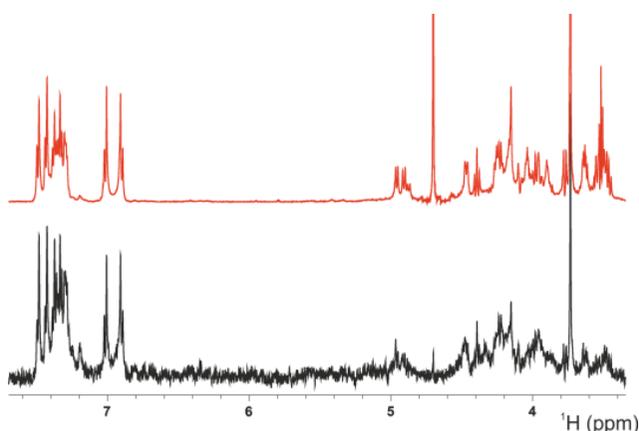
**Figura 4.2.2.21** Espectro NOESY transferido adquirido a 200 ms de tiempo de mezcla y a 298K.

Se midieron las distancias a partir de los NOEs experimentales para el tetrasacárido **2** mostradas en la **tabla 4.2.2.8** a partir del experimento NOESY transferido a diferentes tiempos de mezcla.

Pareja de átomos	Distancia experimental	Pareja de átomos	Distancia experimental
H3A/H1A	2.60	H5C/H1C	2.60
H5A/H1A	2.40	H4B/H1C	2.89
H3B/H1B	2.60	H3D/H1D	2.73
H5B/H1B	3.17	H5D/H1D	2.60
H3A/H1B	2.79	H3C/H1D	2.33

**Tabla 4.2.2.10** Distancias medidas a 298K para el tetrasacárido **8**.

Para este tetrasacárido se llevó a cabo un experimento STD a una relación de 1:50 entre la proteína y el ligando. Los valores obtenidos fueron bajos debido a un complejo demasiado estable, por lo que se decidió aumentar la cinética del equilibrio mediante el cambio de las proporciones proteína-ligando obteniendo una relación 1:100 aumentando al doble la concentración de ligando. Los espectros obtenidos para este complejo (**figura 4.2.2.22**) muestran una gran interacción (espectro de diferencia) entre las dos especies que participan en el equilibrio. Además, en el espectro de diferencia (negro) se observan las mismas señales que en el espectro de referencia, lo que el ligando muestra una orientación similar a los demás tetrasacáridos situándose el ligando entre los dos dominios de la proteína.



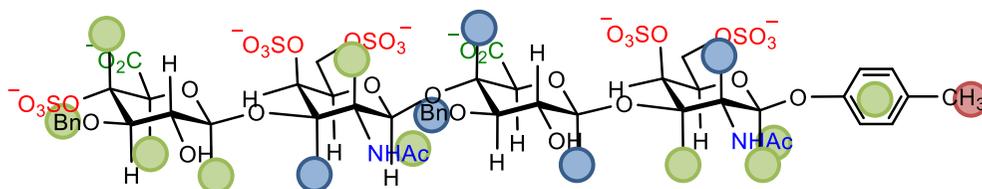
**Figura 4.2.2.22** Espectros monodimensionales obtenidos para el tetrasacárido **8** junto con la proteína a 4 s de saturación y 298K.

Con esta relación proteína-ligando se obtienen valores de  $STD_0$  absolutos indicativos de una gran interacción entre la proteína y el ligando con un valor máximo de 6.0%.

Nombre	$STD_0$ rel./abs.	Nombre	$STD_0$ rel./abs.
H1A	66.7/4.0	H2C	51.4/3.1
H2A	81.1/4.8	H3C	87.5/5.2
H3A	53.1/3.2	H1D	64.6/3.8
H1B	73.5/4.4	H4D	58.6/3.5
H3B	33.6/2.0	BN-1	75.6/4.5
H4B	100/6.0	BN-2	63.8/3.8
H5B	30.0/1.8	CH3 (OMP)	36.0/2.1
Ac	67.5/4.0	Ph (OMP)	61.3/3.6

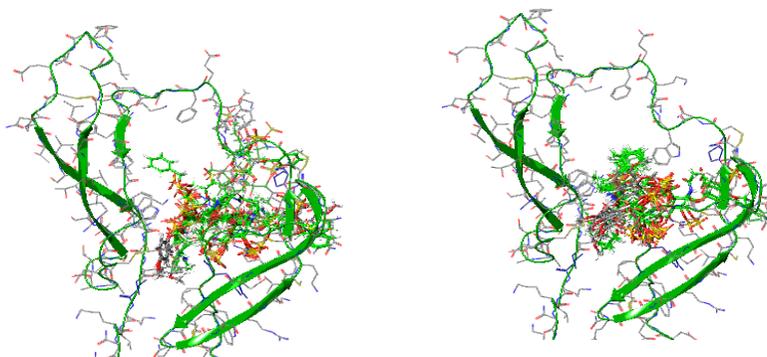
**Tabla 4.2.2.11** Valores de  $STD$  absolutos y relativos obtenidos a 298K para el complejo formado por el tetrasacárido **8** y la Midkina.

El mapa del epítipo (**figura 4.2.2.23**) representa una conformación lineal entre la proteína y el ligando ya que no se distingue ningún otro modo de unión. Así prácticamente todos los hidrógenos reciben saturación de la proteína y no hay anillos que presenten menos porcentaje de saturación.



**Figura 4.2.2.23** Mapa del epítipo obtenido para el tetrasacárido **8** cuando interacciona con la Midkina.

El mismo procedimiento de docking para elucidar la estructura del complejo fue realizado para este tetrasacárido con la Midkina. Los resultados obtenidos para este complejo se muestran en la **figura 4.2.2.24**. En ambos casos se observa una orientación bastante diferente a los otros dos complejos dibencilados. El problema que con los datos experimentales obtenidos no se puede llegar a afirmar un modo de unión diferente para este complejo.

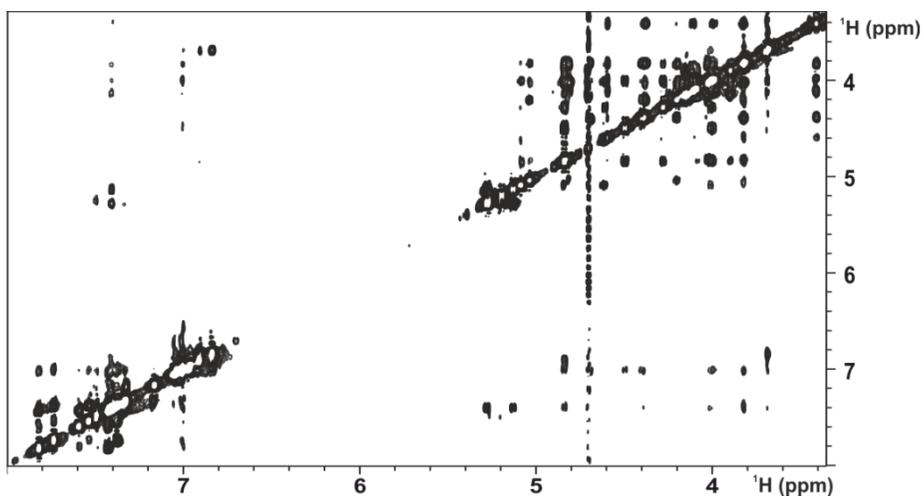


**Figura 4.2.2.24** Representación de las estructuras de los complejos formados por el tetrasacárido **8** y la Midkina obtenidas mediante un docking simple (izquierda) y con precisión extra (derecha).

### 2.3.2.3 Estudio de la interacción entre la Midkina y los tetrasacáridos perprotegidos.

Al preparar las muestras de los tetrasacáridos **9** y **6** para formar los complejos se observa la lógica dificultad de mantener en disolución todos los componentes de las muestras incluso añadiendo DMSO como disolvente. En el caso de **6** no fue posible obtener un espectro de RMN precipitando alguno de los componentes formando disoluciones opalescentes. En el caso del compuesto **9** sí fue posible, por aumento de la cantidad del disolvente DMSO obtener disoluciones con señales suficientemente finas como para poder hacer RMN de alta resolución.

Para analizar la formación del complejo, los experimentos de RMN se realizaron con una proporción de proteína-ligando de 5  $\mu\text{M}$  y 0.59 mg del tetrasacárido **9** en el mismo buffer que todas las muestras y con un 5% de DMSO. El espectro bidimensional NOESY transferido obtenido a 200 ms y 298K se muestra en la **figura 4.2.3.1**. En este se puede observar la gran interacción entre la proteína y el ligando por la presencia de bastantes picos NOEs. Debido a esto, aunque se realizaron experimentos a diferente tiempo de mezcla no se pudieron medir distancias experimentales.



**Figura 4.2.3.1** Espectro bidimensional NOESY transferido obtenido a 200 ms y 298K para el complejo formado por el tetrasacárido **9**.

Los experimentos de STD se llevaron a cabo con la misma proporción proteína-ligando. Debido a la gran interacción del complejo corroborado por el valor de  $IC_{50}$  obtenido mediante Polarización de Fluorescencia (véase apartado 4.2.4), no se pudieron obtener bastantes valores de STD. Además, como dificultad adicional se produce un gran solapamiento entre las señales de los protones anoméricos y los bencilos haciendo imposible la interacción. Por eso los valores de  $STD_0$  absolutos y relativos (**tabla 4.2.3.1**) son escasos y, por tanto, el mapa del epítipo (**figura 4.2.3.1**) no indica ningún modo de unión y, por supuesto, diferente al resto de los complejos formados. Se pensó en realizar una modificación del experimento de STD, mediante un STD-HSQC pero la baja cantidad de muestra no lo permitió.

Nombre	STD <sub>0</sub> rel./abs.	Nombre	STD <sub>0</sub> rel./abs.
H1A	<b>100/4.8</b>	H2D	93.0/4.5
H2B	95.6/4.6	H4D	93.2/4.5
H4B	80.8/3.9	H5D	91.6/4.41

**Tabla 4.2.3.1** Representación de los valores de  $STD_0$  absolutos y relativos para el complejo formado por tetrasacárido **9** y la Midkina.

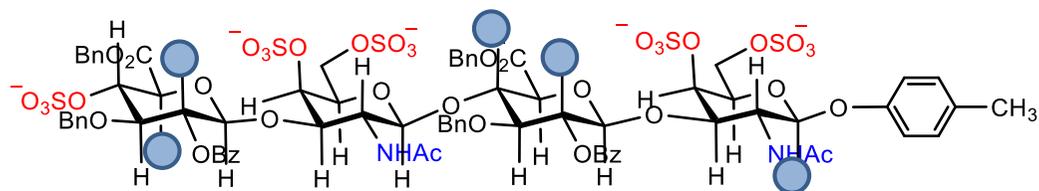


Figura 4.2.3.2 Mapa del epítipo obtenido para el tetrasacárido **9** con la Midkina.

### 4.2.3 Estudio de la interacción de todos los tetrasacáridos mediante experimentos de Polarización de Fluorescencia.

En la **tabla 4.2.4.1** se representan los valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) para los tetrasacáridos que se han podido obtener valores cuantitativos. Para aquellos cuyos valores de inhibición han sido tan bajos (menor del 20 %) se han representados el % de inhibición y no el  $IC_{50}$  (tetrasacáridos **1** y **2**). Estos experimentos para medir la inhibición se han llevado a cabo mediante Polarización de Fluorescencia en el grupo de investigación a  $25 \mu M$  de proteína. La tabla se divide en tres columnas dependiendo del grado de sustitución de los tetrasacáridos.

TETRASACÁRIDOS NO PROTEGIDOS	TETRASACÁRIDOS DIBENCILADOS	TETRASACÁRIDOS PERPROTEGIDOS
Tetrasacárido 1 3%	Tetrasacárido 2 18 %	Tetrasacárido 6 1.3 $\mu M$
Tetrasacárido 4 254 $\mu M$	Tetrasacárido 5 31 $\mu M$	Tetrasacárido 9 3.5 $\mu M$
Tetrasacárido 7 136 $\mu M$	Tetrasacárido 8 27 $\mu M$	
Tetrasacárido 3 8 $\mu M$		
Tetrasacárido 10 10.6 $\mu M$		

**Tabla 4.2.4.1** Representación de los valores de  $IC_{50}$  para todos los complejos formados entre los tetrasacáridos de secuencia híbrida CS/DS, de secuencia CS y alternada. Para los tetrasacáridos **1** y **2** (serie A) se representan valores de % de inhibición y no de  $IC_{50}$  ya que estos muestran interacciones más bajas que los demás tetrasacáridos.

Como se puede observar, los valores de  $IC_{50}$  van aumentando dentro de cada una de las series conforme aumenta los grupos sustituyentes bien bencilos o benzoilos. Este valor también aumenta según el grado de grupos sulfato presente en la secuencia. Se debe de tener en cuenta que el tetrasacárido **9** y **10** muestran diferencias en la afinidad con la proteína incluso llegando a tener más afinidad el **9** (con menos grupos sulfato pero más grupos aromáticos) que el **10** (ningún grupo aromático pero más grupos sulfato). En este

punto hay que valorar la influencia de los grupos protectores aromáticos en la interacción con la Midkina. Si se observan los valores de inhibición obtenidos para los tetrasacáridos **1** y **2** (serie A), **4** y **5** (serie B) y **7** y **8** (serie C) se observa que de las 3 series, la serie C (con secuencia de CS normal) presenta mayor inhibición, seguida de la serie B (secuencia CS alternada) y, por último, la serie A (secuencia híbridos CS/DS). Aunque por RMN no se ha podido determinar la influencia de la secuencia en la interacción, estos valores indican cierta influencia. De hecho, al realizarse los experimentos de STD se cambiaron las relaciones proteína-ligando para los 3 complejos dibencilados, para el tetrasacárido **2** se aumentó la relación de la proteína debido a la baja interacción y para el tetrasacárido **8** se aumentó la concentración de ligando debido a la gran interacción que se producía entre la proteína y el ligando. Esta tendencia debería de ser seguida para los tetrasacáridos perprotegidos (**6** y **9**), sin embargo, el **9** de la serie C presenta un  $IC_{50}$  mayor que le **6** (serie B). Esto puede ser debido al grupo Levulino presente en el extremo reductor del tetrasacárido **6** el cuál podría intervenir en la interacción.

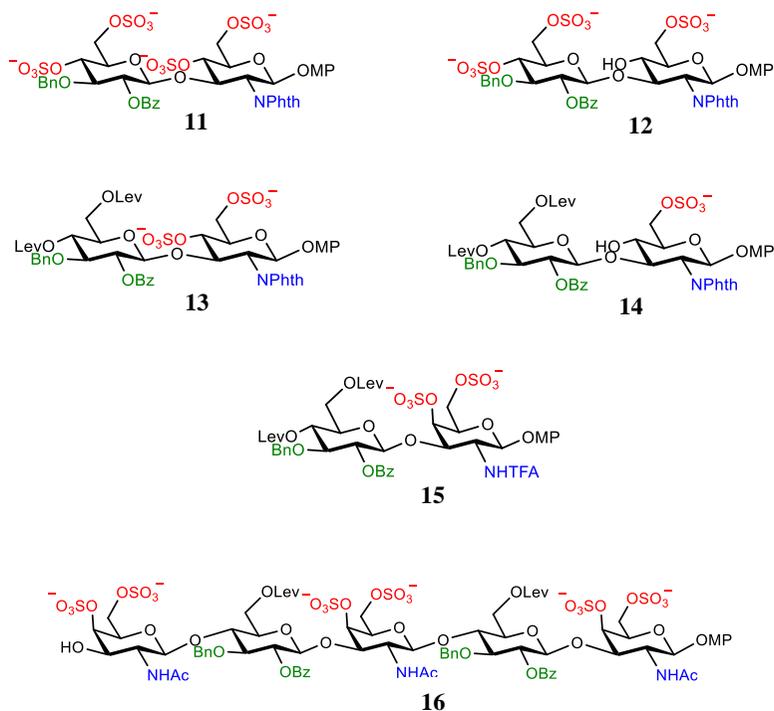
Tanto por los datos de inhibición como por los experimentos de STD, se pudo determinar que al aumentar la hidrofobicidad o aromaticidad en todas las series se aumenta la interacción con la Midkina. Lo que sugiere que además de la interacción electrostática ya conocida pueda existir algún tipo de interacción hidrofóbica o  $\pi$ - $\pi$  que se produzca entre los tetrasacáridos sintéticos dibencilados y perprotegidos y los aminoácidos aromáticos de la proteína que se orientan hacia el interior de la misma, en la zona de enlace con los GAGs.

### **4.3 ESTUDIO DE LOS DISACÁRIDOS EN SU FORMA LIBRE Y COMPLEJADA.**

Para determinar el papel de las interacciones hidrofóbicas o  $\pi$ - $\pi$  se prepararon miméticos disacarídicos en los que diferentes anillos de ácido urónico (IdoA o GlcA) presentes en CS y Hp fueron reemplazados por otros más simples y químicamente más accesibles. Además, todos ellos presentan grupos aromáticos para valorar la aromaticidad en función de la intensidad.

### 4.3.1 Estudio estructural de miméticos de CS en su forma libre mediante técnicas de RMN y dinámica molecular.

La **figura 4.3.1.1** representa todas las estructuras de los disacáridos a estudiar en su forma libre pero complejada sólo se van a estudiar del **11** al **13** con la misma secuencia y el **15**. Esto se debe a que como se verá más adelante el disacárido **14** presenta problemas en la preparación de la muestra debido a que sólo presenta un grupo sulfato por lo que no es conveniente realizar el estudio del complejo y para el pentasacárido se prevé una gran interacción dificultando las condiciones óptimas para el equilibrio entre la especie enlazada y libre y, por tanto, la obtención de los experimentos de STD.



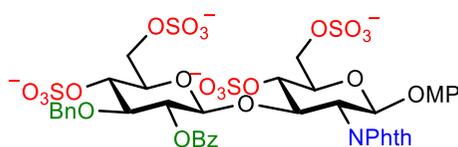
**Figura 4.3.1.1** Representación de las estructuras estudiadas con la Midkina. Del **11** al **14**, disacáridos con secuencia derivada de la Hp (GlcN-Glc) y el **15** y **16** GAGs con secuencia derivada del CS (GalN-Glc) con diferente longitud.

Para la determinación estructural de los ligandos libres, es decir, sin presencia de proteína, se realizaron dos tipos de estudios, uno *cualitativo* y otro *cuantitativo* para cada uno de los disacáridos. El primero, consistió en el empleo del patrón de NOEs interresiduales observado, obteniendo aquellas conformaciones posibles experimentalmente. Además, esto fue complementado con las dinámicas moleculares (libre o con restricciones) apropiadas para cada compuesto, las cuáles indican las conformaciones preferidas energéticamente a lo largo del tiempo. Este estudio

*cuantitativo* se realizó para todos los disacáridos. Sin embargo, el segundo estudio, que consistía en la medida de las distancias interprotónicas a partir del valor de  $\sigma^{\text{NOE}}$  y de los ángulos diedros de los cuales se obtienen constantes de acoplamiento, tanto de forma experimental como teórica (*cuantitativo*), no se realizó para todos los compuestos debido a varios factores que se explicarán más adelante. Para los tetrasacáridos persustituídos se había mostrado que se producía un gran agregado aumentando el tiempo de correlación, lo cual dificultaba o imposibilitaba la realización de este análisis *cuantitativo*. Se puede pensar, *a priori*, que los miméticos deberían presentar características similares a los tetrasacáridos debido a la naturaleza de los anillos del esqueleto y a la presencia de grupos hidrofóbicos. Además, debería de presentar gran interacción con la Midkina, como los tetrasacáridos. Por ello, se prepararon miméticos de Hp y CS variando el patrón de sulfatación, el cual podría provocar un cambio en las características de la muestra. Se han cambiado los anillos de GlcA e IdoA de la Hp y CS por Glc. Además, algunos de los compuestos presentaban grupos levulinos no estudiados hasta ahora en esta tesis doctoral y los cuales también podrían influir en las características de la muestra.

#### 4.3.1.1 Disacárido 11.

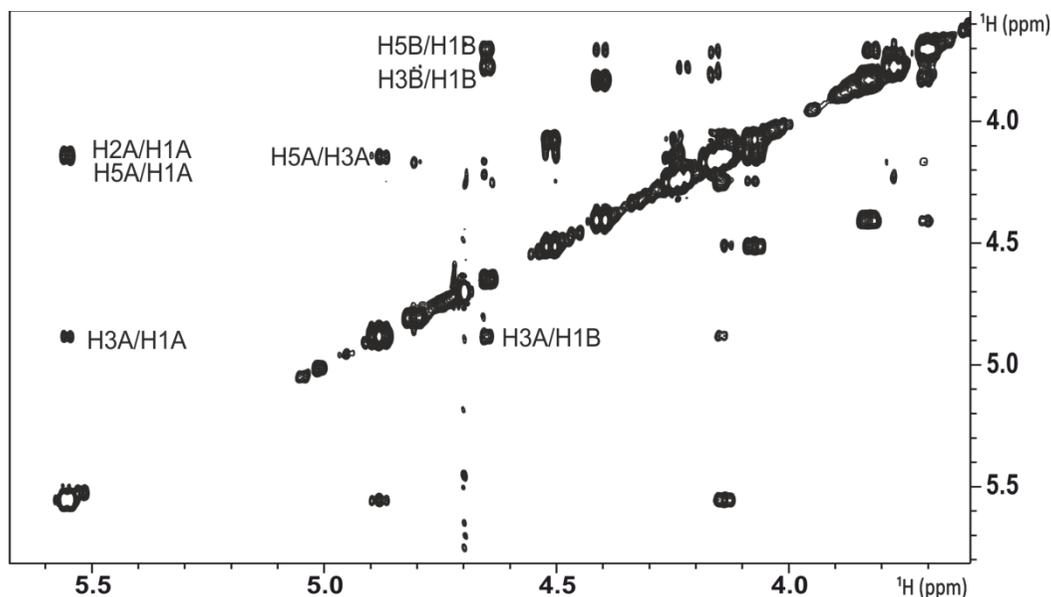
Estructura del disacárido mimético de Hp (GlcN-Glc) mostrando 4 grupos  $\text{SO}_3^-$  y dos grupos aromáticos (**figura 4.3.1.2**).



**Figura 4.3.1.2** Representación del disacárido **11** con secuencia derivada de la Hp en la que se ha sustituido un anillo de IdoA por Glc sulfatado en las posiciones 4 y 6 mostrando un total de 4 grupos  $\text{SO}_3^-$  y dos grupos aromáticos.

Los experimentos de asignación para este disacárido fueron HSQC, COSY, TOCSY, NOESY y 1D-NOESY utilizando experimentos sensibles a la fase, con filtro de cero cuanto, sensibilidad incrementada y eco-antieco cuando fuese conveniente. Las condiciones experimentales en la preparación de la muestra fueron: concentración del disacárido de 1.5 mM en 200  $\mu\text{L}$  de buffer 1xPBS. Para la realización del análisis *cuantitativo* se llevó a cabo un experimento NOESY a 500 ms (**figura 4.3.1.3**). Los picos

de cruce NOEs obtenidos revelan una conformación  ${}^1C_4$  para los dos anillos debido a la presencia de picos NOEs H1X/H5X.

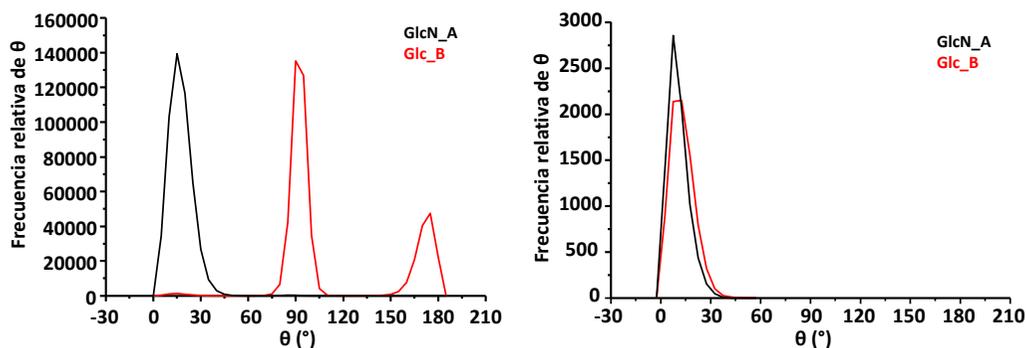


**Figura 4.3.1.3** Espectro bidimensional obtenido para el disacárido **11** a un tiempo de mezcla de 500 ms y 16 escanes de 256 fides y 4096 puntos cada una.

Para analizar las conformaciones energéticamente más favorables de los diferentes anillos se llevó a cabo una dinámica molecular libre de 500 ns. El análisis de las coordenadas de plegamiento durante toda la trayectoria (**figura 4.3.1.4**) muestra que el anillo de GlcN (el anillo del extremo reductor\_A) se mantiene constante en una conformación  ${}^4C_1$  durante toda la trayectoria realizada (**figura 4.3.1.4** trayectoria representada en negro). Sin embargo el anillo de Glc presenta dos valores diferentes para  $\theta$ ,  $90^\circ$  y  $180^\circ$ , indicando un equilibrio conformacional como mínimo entre dos conformaciones (**figura 4.3.1.4** representación de la trayectoria en rojo). Es muy conocido que cuando  $\theta$  es  $180^\circ$  la conformación predominante es  ${}^4C_1$  pero cuando es  $90^\circ$  se debe de analizar la coordenada  $\phi$  durante toda la simulación. En este caso, tal coordenada presenta valores entre  $330^\circ$  y  $30^\circ$  pasando por  $0^\circ$  indicando un equilibrio conformacional entre una conformación de bote ( ${}^3_0B$ ) y dos de bote torcido ( ${}^0S_2$  y  ${}^3S_1$ ) las cuales se pueden agrupar como una. Según estudios llevados a cabo para la Hp la cual presenta un anillo de GlcN sulfatado en las posiciones 2 y 6 las estructuras obtenidas mediante técnicas de RMN y de DM mostraban una conformación fija para este anillo mientras que el anillo que mostraba un equilibrio conformacional era el IdoA.

Esta diferencia de conformaciones puede deberse a la sustitución por grupos aromáticos al igual que ocurría en el caso de los anillos de GlcA para los tetrasacáridos los cuales también estaban sustituidos. Además, las cargas negativas presentes en el disacárido estudiado se encuentran en un lado del eje longitudinal lo que puede provocar una desestabilización de los anillos por repulsión de cargas. A pesar de que las cargas de los anillos han sido ajustadas en función de los grupos sulfato presentes. La influencia de los grupos protectores en la dinámica molecular es más trascendente que para los resultados experimentales.

Al igual que para los tetrasacáridos, se llevó a cabo una DM con restricciones promediadas en el tiempo de 8 ns. En este caso, se aplicó como referencia una distancia experimental obtenida de los NOEs a 290 K. Para el anillo B que presentaba más movimiento se usó H2/H4 de 2.3 Å y para el anillo B se utilizó H3/H5 de 2,6 Å. La coordenada theta para los dos anillos (**figura 4.3.1.4\_derecha**) representa una conformación  ${}^4C_1$ , confirmando los datos experimentales.



**Figura 4.3.1.4** El gráfico de la izquierda representa la coordenada  $\theta$  obtenida del análisis de la trayectoria de la DM sin restricciones a 500 ns. En negro se representa dicha coordenada para el anillo de GlcN (A) y en rojo para el anillo de Glc (B). Se representa con un margen de 30° desde el valor mínimo y máximo ya que dichos valores no son 0 y 180° fijos.

El análisis *cuantitativo* del disacárido **11** consistió en la medida de las constantes de acoplamiento y distancias experimentales. Para una conformación canónica  ${}^4C_1$  los hidrógenos de los anillos se orientan en disposición axial mostrando valores de constantes de acoplamiento grandes para todas las parejas de hidrógenos medidas a 298K (**tabla 4.3.1.1**) confirmando una conformación  ${}^4C_1$  obtenida experimentalmente para los dos anillos de Glc. Además, dichas constantes experimentales están de acuerdo

con las  $^3J_{HH}$  obtenidas de la simulación de la dinámica molecular con restricciones en la cual los anillos permanecen fijos.

	$^3J_{HH}$ experimental	$^3J_{HH}$ dinámica libre	$^3J_{HH}$ dinámica restricciones
H1A/H2A	8.6	8.6	8.0
H2A/H3A	10.7	10.5	10.0
H3A/H4A	8.4	8.7	8.9
H4A/H5A	9.8	9.7	9.8
H1B/H2B	7.7	2.9	7.5
H2B/H3B	9.5	1.4	9.9
H3B/H4B	9.2	2.4	9.1
H4B/H5B	9.8	2.7	10.3

**Tabla 4.3.1.1** Valores de las constantes de acoplamientos obtenidos experimentalmente a 290K y mediante dinámicas moleculares con y sin restricciones a 298K.

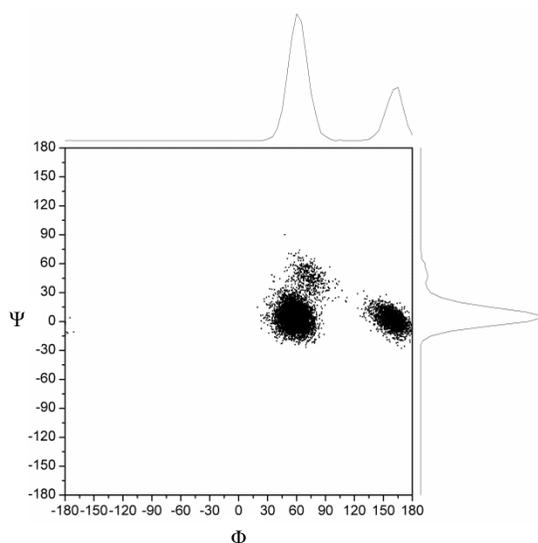
Las distancias medidas experimentalmente obtenidas del valor de  $\sigma^{\text{NOE}}$  se representan en la **tabla 4.3.1.2** (columna de la izquierda). Estas distancias experimentales fueron medidas a 290K para alejar la señal procedente del H<sub>2</sub>O de la señal del hidrógeno anomérico del anillo B favoreciendo así la especie más estable en el equilibrio. Las distancias que se han podido medir con cierta precisión han sido muy pocas debido a la poca dispersión química de las señales. Como cabría esperar, las distancias medidas para el anillo A a partir de la dinámica con restricciones son más parecidas a las experimentales indicando la conformación obtenida anteriormente.

	Distancia experimental	Distancia dinámica libre	Distancia dinámica restricciones
H2A/H1A	2.50*	3.03	
H5A/H1A	2.50*	2.51	2.54
H3A/H1A	3.02	2.66	2.64
H5A/H3A	2.63	4.10	2.71
H4B/H2B	2.35		2.58
H3B/H2B	2.96	-	-
H3A/H1B		2.63	2.89

El símbolo \* se refiere a aquellos valores de distancias que no han podido ser medidos de forma aislada debido a que los NOEs se encuentran relativamente próximos.

**Tabla 4.3.1.2** Valores de distancias experimentales obtenidos a partir de  $\sigma^{\text{NOE}}$  A 290K y teóricas medidas a 298K para el disacárido **11**.

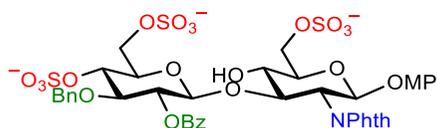
Para determinar la flexibilidad conformacional del disacárido se ha realizado el análisis de la trayectoria de los ángulos ( $\Phi, \Psi$ ) de la DM con restricciones (**figura 4.3.1.5**). Se ha representado esta trayectoria para determinar la flexibilidad del enlace glicosídico cuando los dos anillos presentan la misma conformación ( ${}^4C_1$ ). En este caso, experimentalmente no fue posible la medida del valor de la distancia que definiera el ángulo interglicosídico aunque, a pesar de eso, se observa un pico NOE correspondiente a esa pareja de hidrógenos (**figura 4.3.1.3**) confirmando la geometría syn- $\Psi$  para dicho enlace. Sin embargo, la trayectoria ( $\Phi, \Psi$ ) obtenido de la DM indica dos zonas de mínima energía para el ángulo  $\Phi$  mientras que el ángulo  $\Psi$  se mantiene más rígido mostrando sólo una zona.



**Figura 4.3.1.5** Representación del ángulo glicosídico para el disacárido **11** obtenido de la DM con restricciones.

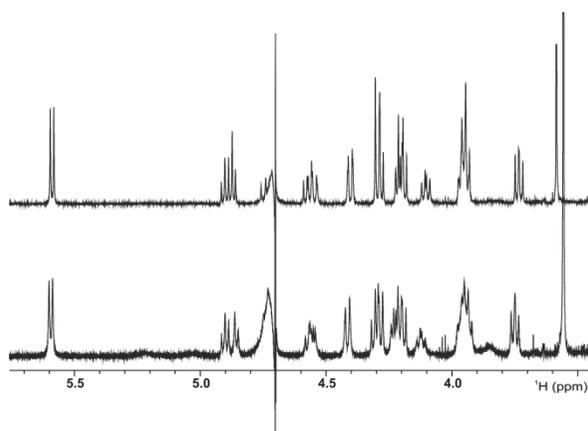
#### 4.3.1.2 Disacárido **12**.

El disacárido **12** presenta un grupo sulfato menos en la posición 2 del anillo de GlcN que el disacárido anterior mostrando la misma secuencia Glc-GlcN (**figura 4.3.1.6**).



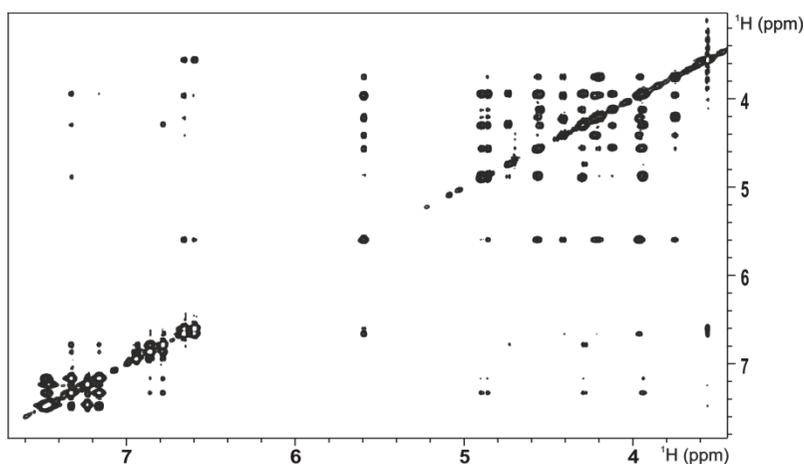
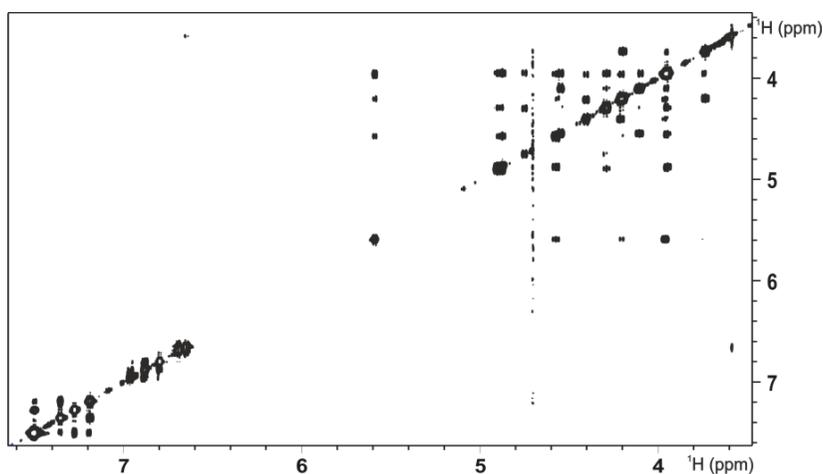
**Figura 4.3.1.6** Representación de la secuencia disacáridica (GlcN-Glc) para el disacárido **12** la cual presenta una sustitución de 3 grupos OH por  $\text{SO}_3^-$  quedando libre la posición 4 del anillo A (extremo reductor).

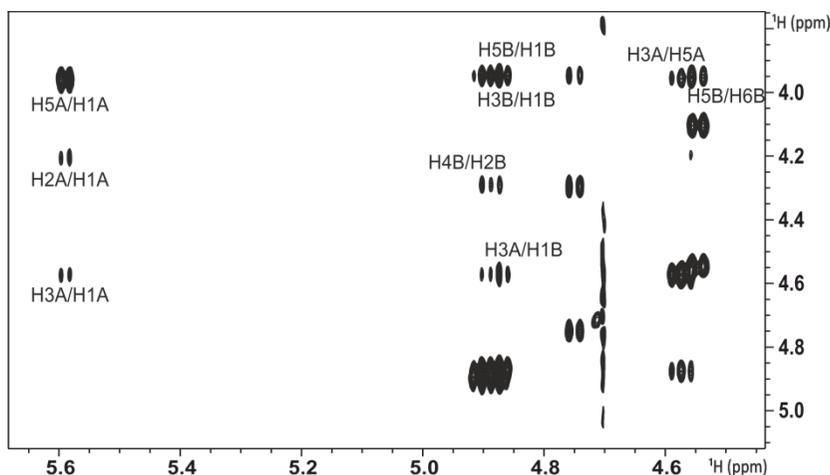
En este caso, para la realización de los experimentos de asignación se preparó una muestra con las mismas condiciones que el disacárido **11** (1.5 mM en 200  $\mu\text{L}$  y 1xPBS) y se llevaron a cabo los mismos experimentos de asignación. A esta concentración de muestra, al igual que ocurría con el tetrasacárido **9** (persustituido) se observó, aunque en menor proporción, un ensanchamiento de las señales debido al aumento del tiempo de correlación (**figura 4.3.1.7 espectro inferior**). Se preparó otra muestra diluyendo la muestra a la mitad con 500  $\mu\text{M}$  de disacárido en 200  $\mu\text{L}$ , 1x PBS y una adición de un 5% de DMSO para favorecer la desagregación de las moléculas de disacárido. En este caso, al disminuir la concentración del disacárido las señales del espectro monodimensional son más finas exhibiendo una diferencia en el tiempo de correlación confirmando una agregación a la concentración de 1 mM (**figura 4.3.1.7 espectro superior**).



**Figura 4.3.1.7** Dos espectros monodimensionales obtenidos para el disacárido **12**. La diferencia entre ambos es la concentración de la muestra. El espectro inferior refleja señales posiblemente más anchas, obtenido a 1 mM de ligando, que el superior obtenido a 500  $\mu\text{M}$ . Los dos se realizaron a 298K.

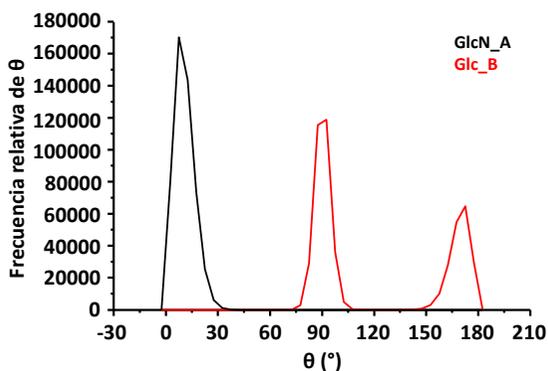
Además de los espectros monodimensionales, en la **figura 4.3.1.8** se representa dos espectros bidimensionales NOESY diferentes. El espectro central refleja una gran cantidad de picos NOEs, atribuibles a una difusión de espín, mostrando un espectro típico de una especie agregada, al igual que ocurría con los tetrasacáridos. El espectro NOESY superior corresponde a la concentración de 500  $\mu\text{M}$  y como era de esperar se observan NOEs en menor cantidad e intensidad, indicativos de una conformación  ${}^4C_1$  (espectro inferior).





**Figura 4.3.1.8** Espectro NOESY superior obtenido a concentración 1 mM de disacárido **12**, espectro central obtenido a 500  $\mu\text{M}$  para el mismo disacárido y el espectro inferior es un zoom del espectro que no presenta agregado.

La DM sin restricciones realizada para este disacárido mostro una conformación canónica de silla  ${}^4\text{C}_1$  para el anillo A (GlcN) y un equilibrio conformacional entre la silla totalmente contraria a lo que se debería de esperar,  ${}^1\text{C}_4$ , y las conformaciones de  ${}^{3,0}\text{B}$ ,  ${}^0\text{S}_2$  y  ${}^3\text{S}_1$  obtenidas para valores de  $\phi$  entre  $330^\circ$  y  $30^\circ$  para el anillo B (Glc) (**figura 4.3.1.9**). Como se pone de manifiesto no se simula en absoluto los datos experimentales con los datos teóricos. Esto indica un desajuste en el campo de fuerzas al introducir los O-sustituyentes en los cálculos, que se realizaron con AMBER-GLYCAM-06.



**Figura 4.3.1.9** Representación de la coordenada  $\theta$  para la simulación de 500 ns realizada a 298K. La línea negra representa la coordenada para el anillo de GlcN y la roja para el anillo Glc.

Siguiendo el procedimiento habitual para obtener valores cuantitativos de las DM para complementar las conformaciones experimentales en disolución se hubiese hecho una DM con restricciones promediadas en el tiempo utilizando distancias de referencia experimentales y comprobando que las  $^3J_{HH}$  experimentales y teóricas son coherentes para la misma conformación. El problema encontrado para este disacárido fue que, aunque se preparó una muestra con una concentración suficientemente baja para obtener los espectros 2D-NOESY a diferentes tiempos de mezcla y así poder medir los valores de  $\sigma^{\text{NOE}}$ , este disacárido no presentaba una gran dispersión en desplazamientos químicos lo cual dificultaba la medida de dicho valor. Como se puede observar, en el espectro HSQC mostrado en el anexo, los desplazamientos químicos en protón para los hidrógenos H1B y H2B son prácticamente similares no pudiendo medir distancias para ese hidrógeno anomérico. El hidrógeno H1A sí aparecía aislado pero el valor de  $\sigma^{\text{NOE}}$  obtenido para la pareja H5A/H1A presenta una intensidad considerablemente mayor que el H3A/H1A. Esto podría indicar una ligera distorsión respecto a la silla canónica sin llegar a confirmarse de forma cuantitativa (**tabla 4.3.1.4**).

Las  $^3J_{HH}$  medidas experimentalmente confirman una conformación  $^4C_1$  para los dos anillos y si son comparadas con las  $^3J_{HH}$  obtenidas de forma teórica a partir de los valores de torsión a lo largo de las dinámicas no se aprecia diferencia en los valores para el anillo A ya que no se produce un cambio de conformación pero no discrepan para el anillo B (**tabla 4.3.1.3**).

Pares de átomos	$^3J_{HH}$ experimental	$^3J_{HH}$ dinámica libre
H1A/H2A	8.5	8.5
H2A/H3A		11.3
H3A/H4A	8.3	8.7
H4A/H5A	8.3	11.0
H1B/H2B	8.1	1.89
H2B/H3B	8.4	1.56
H3B/H4B	9.1	2.54
H4B/H5B		2.71

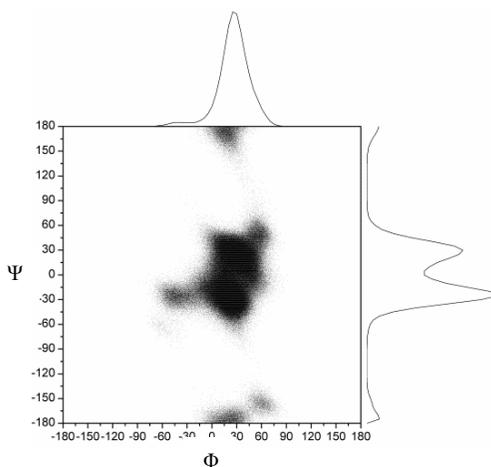
**Tabla 4.3.1.3** Valores de las constantes de acoplamiento medidos a 298K de forma experimental y teórica mediante una dinámica de 500 ns.

Pares de átomos	Distancias experimentales	Distancias dinámica libre
H3A/H1A	3.1	2.75
H5A/H1A	0.49	2.53

H2A/H1A	3.0	3.03
H1B/H3B		4.17
H5B/H3B		4.14
H3A/H1B		2.38

**Tabla 4.3.1.4** Valores de distancias obtenidos para el disacárido **12** medidas a 298K.

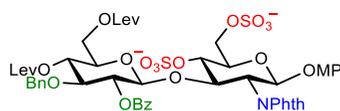
El análisis de la trayectoria de los ángulos ( $\Phi, \Psi$ ) de la DM libre (**figura 4.3.1.10**) presentan tres mínimos de energía, dos centrales equivalentes a una conformación syn + y - y otro una conformación anti, mucho menos poblado. Estos pueden ser reales, o ficticios provocados por el cambio conformacional mostrado por el anillo B. Estos valores no definen una flexibilidad conformacional (syn o anti) de forma fiable. Sin embargo, si se consideran las proporciones (ver proyección en el eje  $\Psi$ ), se observa que si la conformación anti fuese real estaría en un porcentaje muy minoritario comparado con la geometría syn.



**Figura 4.3.1.10** Representación de la trayectoria ( $\Phi, \Psi$ ) para el disacárido **12** obtenida de la dinámica molecular sin restricciones.

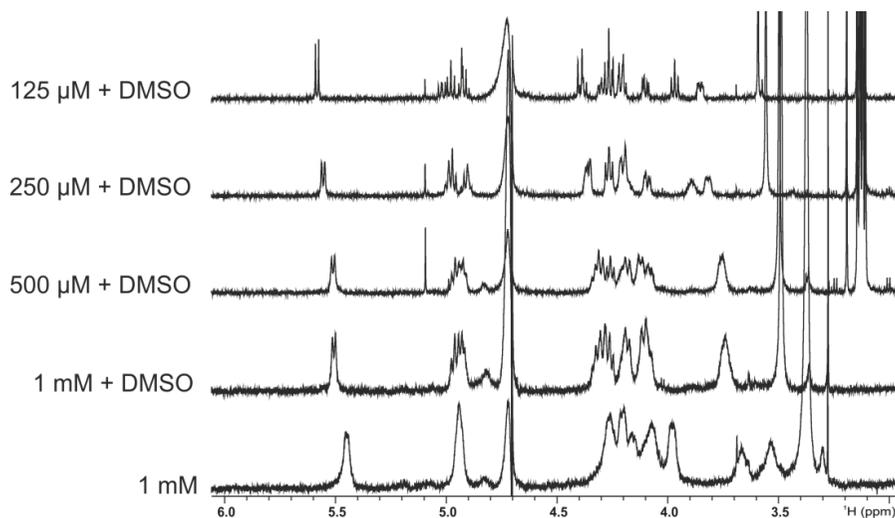
### 4.3.1.3 Disacárido **13**.

Este disacárido presenta la misma secuencia que los dos anteriores (GlcN-Glc) pero posee sólo dos grupos sulfato y los dos en el mismo anillo. Así el anillo de GlcN presenta dos grupos sulfato pero el anillo de Glc sólo presenta sustituyentes aromáticos (Bn y Bz) y alifáticos (Lev).



**Figura 4.3.1.11** Representación de la secuencia disacárido GlcN-Glc para el disacárido **13** la cual presenta dos grupos  $\text{SO}_3^-$ , dos grupos aromáticos y dos grupos alifáticos.

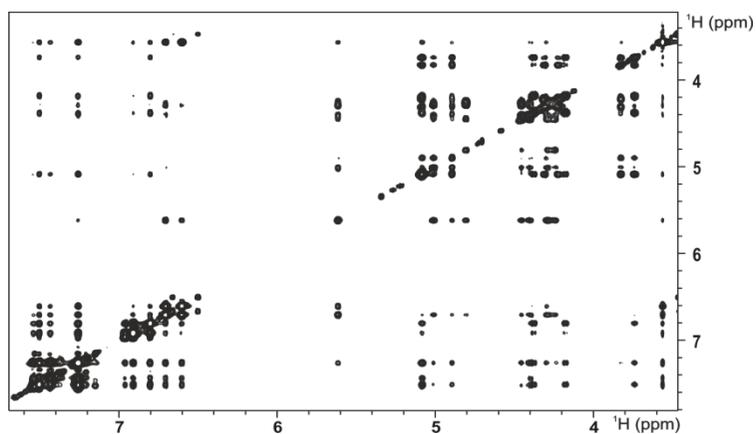
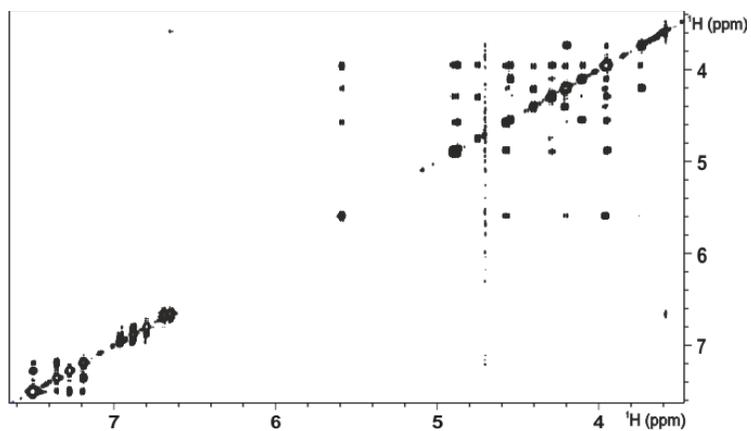
La preparación de la muestra para este disacárido fue mucho más compleja que en los dos casos anteriores. Aunque era lógico pensar que este disacárido presentaría el mismo problema de agregación que el anterior, se decidió seguir con el mismo procedimiento de disminución de concentración de la muestra y adición de DMSO para determinar cualitativamente la influencia de la eliminación de los grupos  $\text{SO}_3^-$ . Para ello se prepararon diferentes muestras a las cuáles se les registró un espectro monodimensional como referencia (**figura 4.3.1.12**). Se observa que el espectro obtenido a  $125 \mu\text{M}$  es el que presenta señales más finas, más típicas de una molécula pequeña, por lo que se puede suponer que a esa concentración no se genera agregado mientras que en los demás casos sí. Claramente se observa la diferencia en la anchura de las señales al ir disminuyendo la concentración.

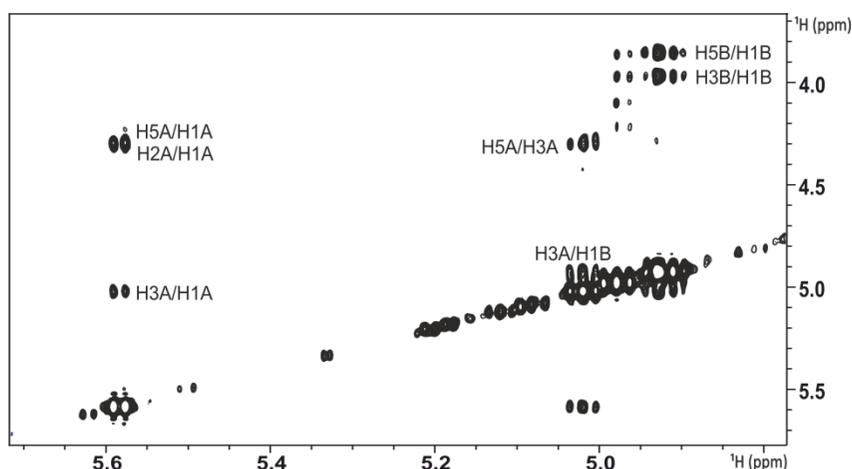


**Figura 4.3.1.12** Representación de los espectros monodimensionales obtenidos para cada una de las concentraciones de ligando que se midieron a 298K para el disacárido **13**.

Los espectros 2D-NOESY (**figura 4.3.1.13**) son compatibles con esta propuesta, se observa la disminución de los picos NOEs en el espectro a menor concentración indicando un cambio en el tiempo de correlación. Del espectro bidimensional obtenido a

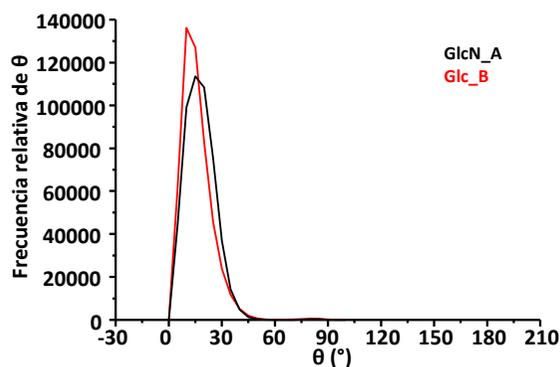
125  $\mu\text{M}$  se han obtenido los picos NOEs para los dos anillos. Así, tanto el anillo A como el B presentan una conformación  ${}^4C_1$  (espectro inferior de la misma figura).





**Figura 4.3.1.13** Espectros obtenidos para el disacárido **13** con diferentes condiciones de muestra. El espectro central fue obtenido a 1 mM, el espectro superior obtenido a 125  $\mu$ M y el espectro inferior es un zoom del espectro superior.

El análisis *cualitativo* de los NOEs interresiduales que indica la conformación de los anillos se complementó con juna DM libre (sin restricciones). Al igual que para los demás disacáridos se analizó las coordenadas de plegamiento  $\theta$  y  $\phi$  a lo largo de 500 ns. Sorprendentemente, estas coordenadas se mantienen estables en una conformación  ${}^4C_1$  para los dos anillos (**figura 4.3.1.14**). Hasta ahora, no se había obtenido esta conformación canónica para el anillo B en la producción de una DM libre para ninguno de los disacáridos expuestos en este capítulo. La diferencia estructural de este disacárido con los anteriores es que presenta un anillo con grupos sulfato como sustituyente y otro anillo con grupos aromáticos. Esto podría estabilizar la energía de cada uno de los anillos. Esta observación podría atribuirse a una interacción electrostática inadecuadamente calculada al introducirse grupos aromáticos como sustituyente en los anillos del esqueleto del carbohidrato.



**Figura 4.3.1.14** Representación de la coordenada  $\theta$  obtenidos de la trayectoria de 500 ns para los dos anillos del disacárido **13**.

Después de este análisis *cualitativo* se midieron  $^3J_{HH}$  y distancias tanto experimentales como teóricas para obtener datos cuantitativos que confirmen la estructura del disacárido. Las  $^3J_{HH}$  medidas indican una conformación anti para todos los hidrógenos correlativos compatibles con una configuración  $^4C_1$  para los dos anillos. Estas coinciden con las obtenidas de las DM sin restricciones debido a que no se produce ningún cambio conformacional de los anillos.

	$^3J_{HH}$ experimental	$^3J_{HH}$ dinámica libre
H1A/H2A	8.4	8.6
H2A/H3A	9.1*	10.5
H3A/H4A	9.1/8.7*	8.5
H4A/H5A	8.7*	9.6
H1B/H2B	7.4	7.1
H2B/H3B	9.7*	8.8
H3B/H4B	9.7*	8.0
H4B/H5B		9.4

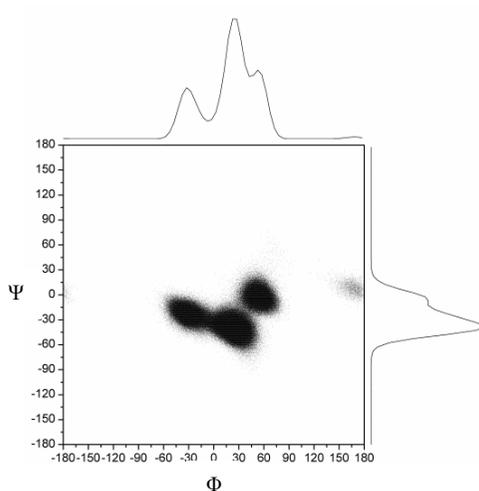
**Tabla 4.3.1.5**  $^3J_{HH}$  obtenidas de forma experimental a 298 K y de forma teórica mediante una dinámica libre de 500 ns para el disacárido **13**.

Las distancias obtenidas del valor de  $\sigma^{\text{NOE}}$  no son muy exactas para la conformación que nos indican los NOEs y las  $^3J_{HH}$  ya que se produce un gran solapamiento de señales dificultando la medida del  $\sigma^{\text{NOE}}$  en la diagonal.

	Distancias experimentales	Distancia dinámica libre
H3A/H1A	2.60	2.68
H5A/H1A	2.37*	2.50
H2A/H1A	2.37*	
H3B/H5B	2.88	2.86
H5B/H1B	2.60	2.49
H3B/H1B	2.60	3.08
H3A/H1B	2.69	2.37

**Tabla 4.3.1.6** Tabla representativa de las distancias experimentales obtenidas a 293K y hasta 500 ns para el disacárido **13**.

En la última parte del estudio para este disacárido que es la flexibilidad conformacional mostrada por los enlaces de torsión y por los NOEs interglucosídicos se deben de mencionar varios aspectos. Por un lado, se observa un pico NOE indicativo de una conformación *syn-Ψ* aunque no se pudo medir cuantitativamente debido a poca dispersión espectral (en ppm) obtenida para los dos hidrógenos que forman este enlace de torsión (H3A/H1B). Además, no hay ninguna evidencia experimental que indique otra geometría para ese enlace. Por otro lado, la trayectoria observada para dicho enlace mediante DM libre (**figura xxx**) presenta varios mínimos pero todos son compatibles con la geometría *syn*

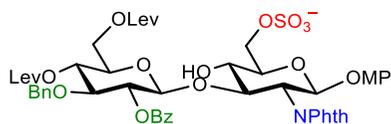


**Figura 4.3.1.15** Representación de la trayectoria ( $\Phi, \Psi$ ) para el ángulo glicosídico obtenida para el disacárido **13**.

Aunque para este disacárido se produce una estabilidad en la energía de los anillos mostrando una única conformación a lo largo de 500 ns la estructura global obtenida teóricamente no es complementaria totalmente con la estructura del disacárido en disolución (real) aunque esta estructura sí se obtiene en un tramo de la producción de la DM.

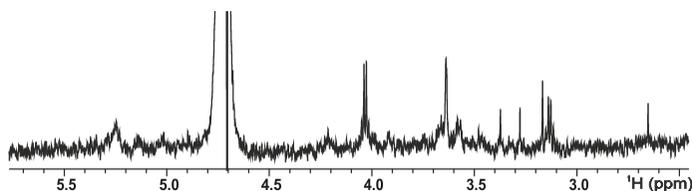
#### 4.3.1.4 *Disacárido 14.*

Este disacárido es el que menos grupos sulfato presenta. Además de no mostrar ninguno en el anillo de Glc tampoco muestra en la posición 4 del anillo de GlcN (**figura 4.3.1.16**).



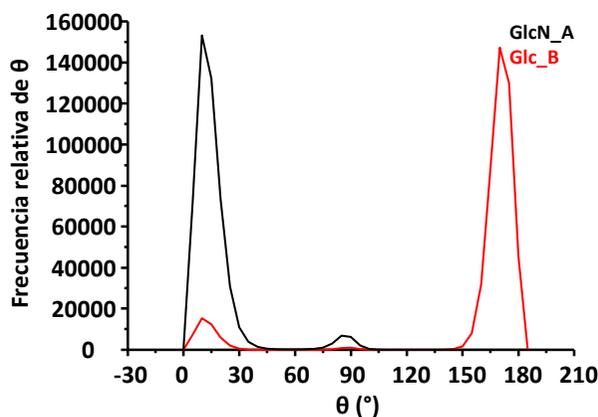
**Figura 4.3.1.16** Representación de la estructura del disacárido **14** el cual muestra una secuencia tipo GlcN-Glc sólo con un grupo sulfato en la posición 6 del anillo de GlcN.

Como era de esperarse incluso a baja concentración (125  $\mu\text{M}$  en 200  $\mu\text{L}$  de 1xPBS) se presenta en forma de agregado (**figura 4.3.1.17**). Ni siquiera en las condiciones más diluidas era imposible registrar espectros con una relación señal/ruido adecuada, que no mostrase evidencias de agregación. En este caso la disminución de las cargas del disacárido no era capaz de compensar la hidrofobicidad de los sustituyentes adicionales.



**Figura 4.3.1.17** Espectro monodimensional obtenido a 125  $\mu\text{M}$  de disacárido **14** a 298K.

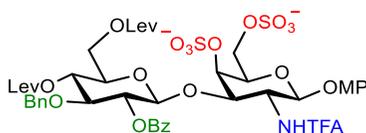
La excesiva anchura de las señales hizo imposible el registro de un espectro 2D-NOESY para analizar la conformación. Se supone que presente una estructura similar a los demás disacáridos ya que no se ha puesto de manifiesto ninguna evidencia de la influencia de los grupos sulfato en las estructuras para los demás disacáridos. De todas formas, se llevó a cabo una DM libre de 500 ns para este disacárido. En este caso, el anillo A se mantiene constante en una conformación <sup>4</sup>C<sub>1</sub> mientras que el anillo B también se mantiene constante, pero con una conformación <sup>1</sup>C<sub>4</sub>, una conformación estable pero que no podría ser posible (**figura 4.3.1.18**).



**Figura 4.3.1.18** Representación de las coordenadas de plegamiento  $\theta$  para los dos anillos del disacárido **14** obtenida de una dinámica molecular libre a 500ns.

#### 4.3.1.5 Disacárido 15

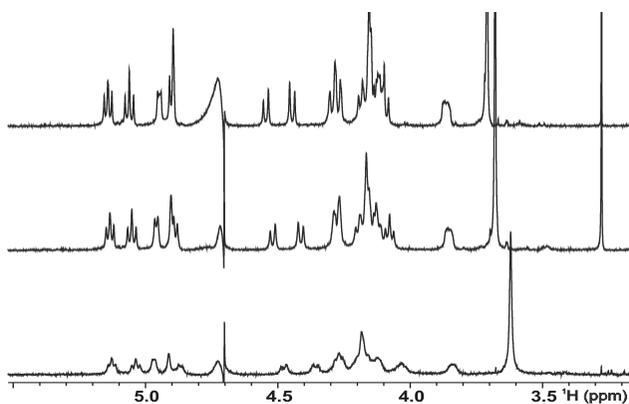
Este disacárido presenta una secuencia diferente a los anteriores, en este caso el anillo de GlcN se sustituye por uno de GalN. Pero sólo este anillo presenta grupos sulfato en las posiciones 4 y 6.



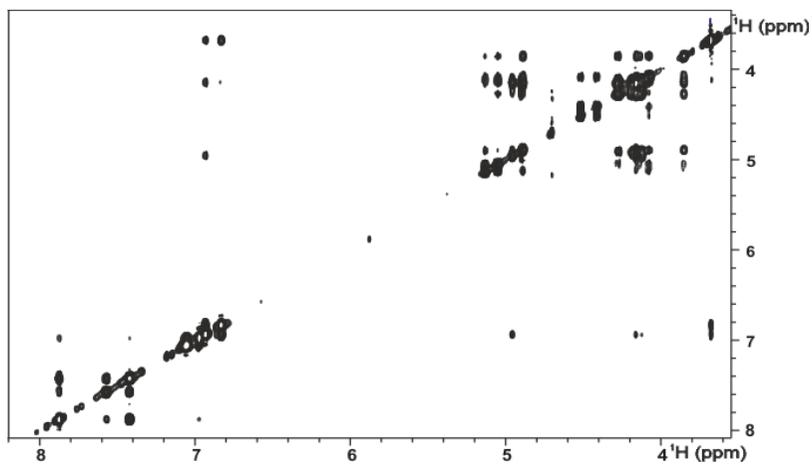
**Figura 4.3.1.19** Representación disacáridica del disacárido **15** formado por GalN-Glc presentando sólo 2 grupos sulfato en el anillo de GalN.

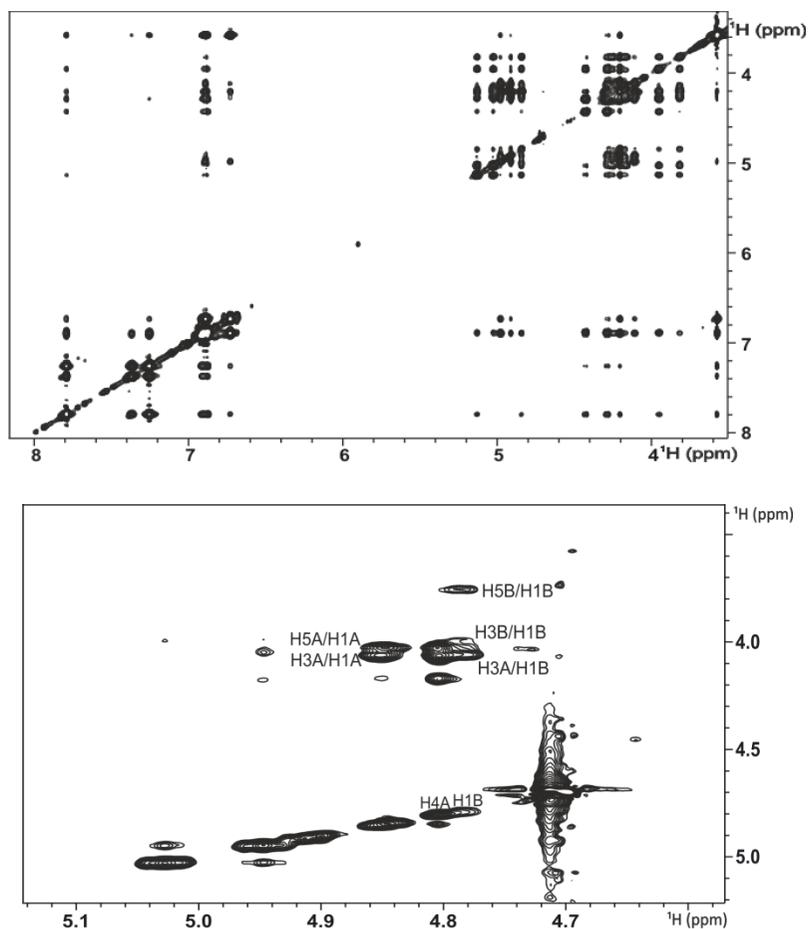
Este disacárido presenta el mismo patrón de sustitución de compuestos hidrofóbicos, alifáticos y sulfatos que el disacárido **13** el cual presentaba en condiciones “normales” de trabajo, 1.5 mM de disacárido señales anchas indicativas de una aumento del tiempo de correlación. Se observa que el espectro central y superior (**figura 4.3.1.20**) con una concentración de 125  $\mu$ M y un 5% y un 10% de DMSO respectivamente presentan señales más finas que el espectro inferior obtenido a 1.5 mM. En este caso no hay tanta influencia del aumento de DMSO en la muestra. Así los dos espectros NOESY obtenidos (**figura 4.3.1.21**) fueron para la muestra concentrada y para la diluida con un 5% de DMSO debido a que con esta muestra ya se podía obtener un NOESY con el que se pudiese llevar un análisis cuantitativo sin necesidad de añadir más DMSO que podría afectar a la conformación.

Aunque hay un gran solapamiento de señales en dos rangos de desplazamientos químicos (5.1-4.8 y 4.2-4), se han podido determinar algunos picos NOEs típicos de una conformación  ${}^4C_1$  para los dos anillos.



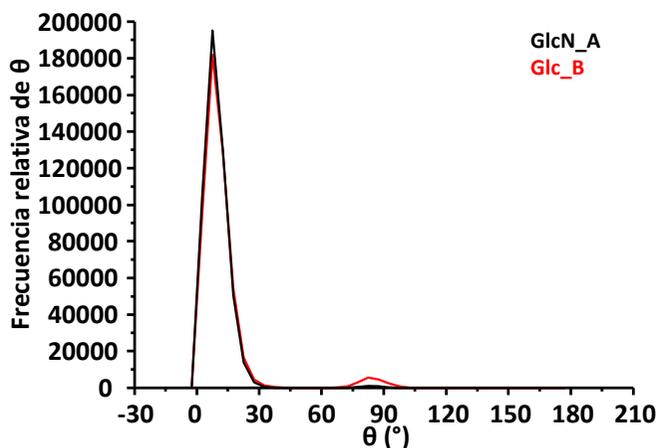
**Figura 4.3.1.20** Representación de los tres espectros monodimensionales obtenidos para el disacárido **15**. El espectro inferior fue realizado con una muestra que contenía 1.5 mM de ligando mientras que el central y el superior se realizaron con una concentración de ligando de 125  $\mu$ M con un 5% y 10% de DMSO respectivamente.





**Figura 4.3.1.21** Espectros 2D-NOESYs obtenidos a 400 ms para el tetrasacárido **15** a diferente concentración y 298K. El espectro central muestra un agregado provocado por una concentración de 1.5 mM de ligando. Mientras que el espectro superior refleja un espectro 2D típico de un ligando libre en el cual se ha llevado a cabo un zoom para determinar la conformación de los anillos (espectro inferior).

Para acabar con el análisis *cualitativo* se llevó a cabo una DM libre de 500 ns. En este caso, al igual que para el disacárido **13** que sólo presentaba grupos sulfato en un anillo ocurre que se obtiene sólo una conformación para cada uno de los anillos indicando una estabilidad energética (**figura 4.3.1.22**). De nuevo la estabilización en la DM de las conformaciones parece indicar que la discordancia entre los datos experimentales y las simulaciones deben ser ocasionadas por un efecto de la energía electrostática. (Qué energía utilizamos ;)



**Figura 4.3.1.22** Representación de la coordenada de plegamiento  $\theta$  para los dos anillos del disacárido 15.

Se midieron las  ${}^3J_{HH}$  posibles experimentalmente (**tabla 4.3.1.7**). Para el anillo A sólo se puede medir una constante mientras que para el anillo B se obtuvieron algunas más indicando una conformación  ${}^4C_1$  debido a la obtención de valores grandes para todas las parejas de hidrógenos.

A pesar de la dilución todavía debe haber algún tipo de agregación como indican picos de cruce a muy larga distancia H2/H5 atribuibles a difusión de spin de un agregado de alta masa. Se decide no cuantificar estas distancias experimentales debido a la difusión de espín detectada.

Anillo A	${}^3J_{HH}$ experimental	${}^3J_{HH}$ DM sin restricciones
H1A/H2A	7.5	8.2
H2A/H3A		10.2
H3A/H4A		3.1
H5A/H6A		4.2
H1B/H2B	8.1	7.3
H2B/H3B	9.0	9.6
H3B/H4B	9.3	9.3
H4B/H5B		9.4

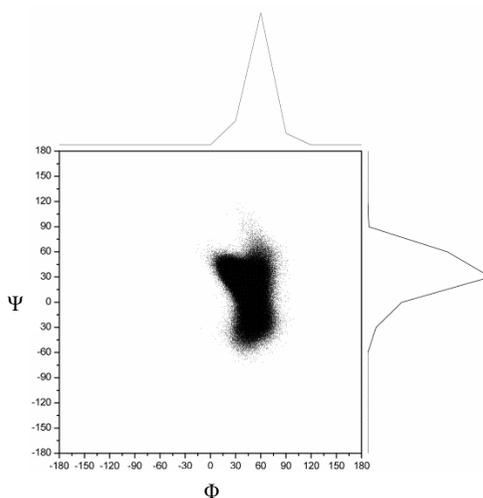
**Tabla 4.3.1.7** Valores de las constantes de acoplamiento medidas a 298K de forma experimental y de forma teórica mediante una dinámica libre de 500 ns.

Las distancias experimentales también fueron medidas a partir del valor de  $\sigma^{\text{NOE}}$  aunque como se observa en la **tabla 4.3.1.8** esos valores fueron muy escasos.

Pareja de átomos	Distancias experimentales	Distancias dinámica libre
H3A/H1A	2.60	2.71
H5A/H1A	2.89	2.57
H1B/H3B	2.77	2.90
H5B/H3B	2.45	2.55

**Tabla 4.3.1.8** Dinámicas medidas experimentalmente a partir del valor de  $\sigma^{\text{NOE}}$  para cada protón medido y teóricamente a partir de una dinámica libre de 500 ns para el disacárido **15**.

Por último, para este disacárido, se analizó la trayectoria ( $\Phi, \Psi$ ) de los datos de la DM libre. En este caso sólo presenta una geometría syn- $\Psi$ , es decir, un único mínimo energético (**figura 4.3.1.23**).



**Figura 4.3.1.23** Representación de la trayectoria  $\Phi, \Psi$  para el disacárido **15**.

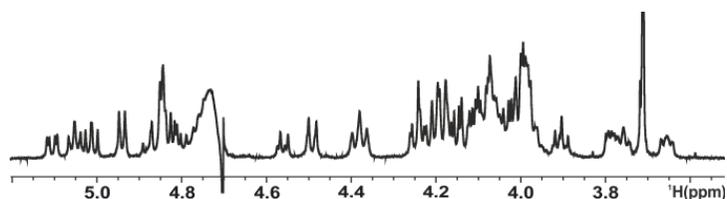
#### 4.3.1.6 Pentasacárido **16**.

Este pentasacárido se sintetizó con la misma secuencia que el disacárido **15** pero con más longitud (**figura 4.3.1.24**).



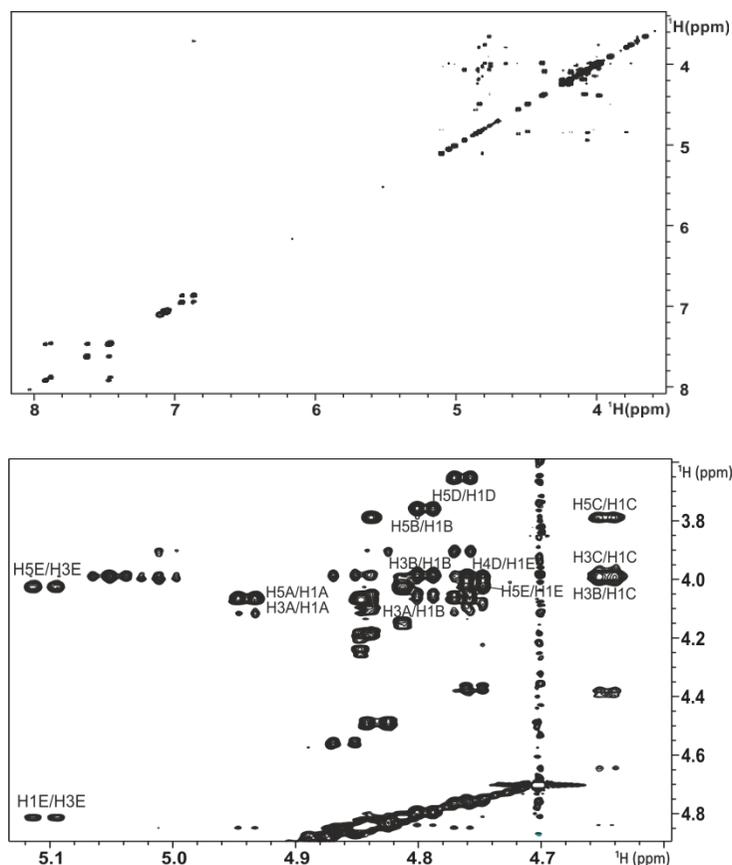
**Figura 4.3.1.24** Representación de la secuencia del pentasacárido **16** (GalN-Glc). Es un mimético de CS al igual que el disacárido **15**.

El patrón de los grupos protectores y sulfatos se mantenía igual presentando así un pentasacárido persustituido al igual que los tetrasacáridos persustituidos ya estudiados en este capítulo. Así se podría determinar, por un lado, la influencia de la longitud de la cadena y el aumento de grupos sulfato en el tiempo de correlación comparando los resultados con el disacárido **15** y por otro lado, la influencia del cambio de secuencia comparando con los tetrasacárido persustituidos (compuestos **6** y **9**). Adicionalmente el mayor número de grupos sulfato mejora ostensiblemente es solubilidad. En este caso, para comenzar con los experimentos de asignación se preparó una muestra de 1 mM de compuesto en 550  $\mu$ L y buffer 1xPBS. En este caso el espectro monodimensional obtenido (**figura 4.3.1.25**) no presenta señales anchas aunque sí existe un gran solapamiento de señales debido al gran número de protones que este pentasacárido presenta.



**Figura 4.3.1.25** Espectro monodimensional obtenido para el pentasacárido **16** a 298 K y 1 mM de ligando.

De forma cualitativa, tenemos evidencias de que este pentasacárido que presenta mayor longitud y número de grupos sulfato aumenta la solubilidad de la muestra comparada con los disacáridos y con los tetrasacáridos persustituidos. Por eso, es posible llevar a cabo un análisis cuantitativo para determinar la estructura tridimensional con unas condiciones de trabajo “normales”. Según los NOEs observados en el espectro 2D-NOESY (hacer zoom y señalar los característicos) (**figura 4.3.1.2**) se muestra claramente una conformación <sup>4</sup>C<sub>1</sub> para cada uno de los anillos.



**Figura 4.3.1.26** Espectro bidimensional NOESY obtenido a 298K y 1 mM para el pentasacárido **16** (superior) y zoom de ese espectro (inferior).

Las constantes de acoplamiento medidas experimentalmente son compatibles con una conformación de  ${}^4C_1$  para los anillos de GalN (A y E) ya que se han medido para las parejas de protones H1A/H2A y H2A/H3A constantes grandes y para H3A/H4A una constante intermedia debido a la disposición ecuatorial del hidrógeno 4. Para los anillos B y D se han medido constantes grandes mostrando una conformación  ${}^4C_1$  para los anillos de Glc. Para el anillo C ha sido imposible medir  ${}^3J_{HH}$ .

Anillo A	${}^3J_{HH}$	Anillo B	${}^3J_{HH}$	Anillo D	${}^3J_{HH}$	Anillo E	${}^3J_{HH}$
H1A/H2A	8.2	H1B/H2B	7.9	H1D/H2D	8.3	H1E/H2E	8.2
H2A/H3A	10.4	H2B/H3B	8.4	H2D/H3D	9.1*	H2E/H3E	11.0
H3A/H4A	3.3	H3B/H4B		H3D/H4D	9.1*	H3E/H4E	3.3
H4A/H5A		H4B/H5B	7.9	H4D/H5D		H4E/H5E	

**Tabla 4.3.1.9** Valores de las constantes de acoplamiento medidas a 298K para el pentasacárido **16**.

Debido al gran solapamiento en las señales por la longitud del compuesto y la gran cantidad de grupos bencilos se ha llevado a cabo experimentos 1D-NOESY desde el hidrógeno H1A. Para los demás anillos, se han llevado a cabo experimentos 1D-TOCSY-NOESY ya que las señales de los anoméricos no se encontraban aisladas. Para este pentasacárido se observan los picos NOEs característicos de una conformación  ${}^4C_1$  para todos los anillos. Las distancias que se han podido medir (**figura 4.3.1.10**) son distancias cortas para los hidrógenos H1/H3 de todos los anillos, excepto para el anillo C, indicando la misma conformación para todos los anillos como era de esperarse. Para el anillo C no se pudo medir ninguna distancia debido a que el protón anomérico se encuentra muy cerca de la señal del agua.

Anillo A	Distancia experimental	Anillo D	Distancia experimental
H3A/H1A	2.60*	H3D/H1D	2.60
H5A/H1A	2.60*	H5D/H1D	2.66
H2A/H1A	2.62	H3C/H1D	2.30
H3B/H1B	2.87	H3E/H1E	2.60
H5B/H1B	2.60	H5E/H1E	2.94
H2B/H1B	2.48	H4D/H1E	2.71
H3A/H1B	2.50		

**Tabla 4.3.1.10** Valores de distancias experimentales para el pentasacárido **16** medidos a 298K.

Para este compuesto no se ha llevado a cabo ninguna DM, ni libre ni con restricciones, debido al gran coste computacional esperado por la longitud y la presencia de grupos aromáticos.

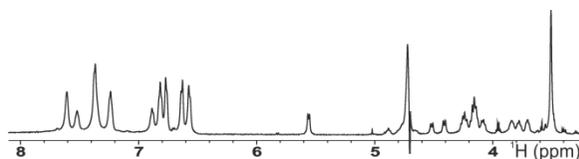
### 4.3.2 Estudio de los complejos formados por los disacáridos y la Midkina mediante RMN y docking.

Esta última parte del capítulo se va a centrar en el estudio de los complejos formados por los disacáridos, cuyas estructuras tridimensionales en su forma libre han sido presentadas anteriormente, con la Midkina. Para ello, se han realizado estudios de RMN del complejo (STD y NOESY transferido) y cálculos teóricos (docking). Como se ha puesto de manifiesto, para la realización de los experimentos de asignación y de determinación estructural se necesitó preparar varias muestras hasta obtener la concentración de ligando a la cual no se producía un agregado y permitía la realización

del análisis *cuantitativo*. Para los experimentos de interacción se prepararon muestras con diferentes relaciones proteína-ligando para obtener señales en el espectro  $^1\text{H}$ -STD que fuesen fiables y medibles. Es conocido que la relación para los experimentos de STD debe de estar en el rango de entre 1:50 a 1:100, sin embargo, como se discutirá más adelante para los disacáridos se necesitaron relaciones mucho más altas debido a la gran interacción que se produce entre ellos.

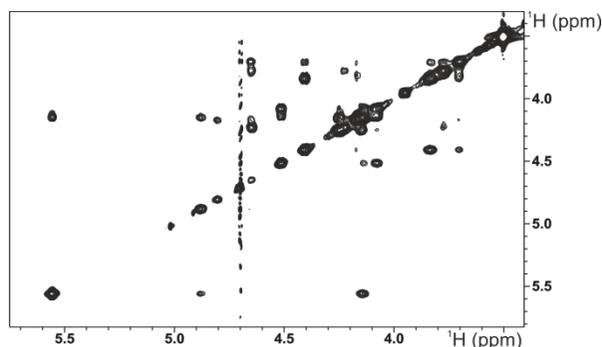
#### 4.3.2.1 Complejo formado con el tetrasacárido **11**.

El disacárido **11** presenta una secuencia GlcN-Glc con 4 grupos  $\text{SO}_3^-$  dos en cada anillo. El complejo que forma con la Midkina será estudiado mediante STD, NOESY transferido y docking. Para los experimentos de RMN se prepararon tres muestras con diferentes relaciones proteína-ligando de 1:30, 1:60 y 1:90 partiendo de 20  $\mu\text{M}$  de Midkina en 250  $\mu\text{L}$  en 1xPBS. Los espectros obtenidos  $^1\text{H}$ -RMN (**figura 4.3.2.1**) muestran señales anchas indicativas de la formación del complejo. Claramente se observa que al aumentar la cantidad de ligando aumenta la proporción de ligando libre con información del complejo en la disolución provocando un afinamiento de las señales.



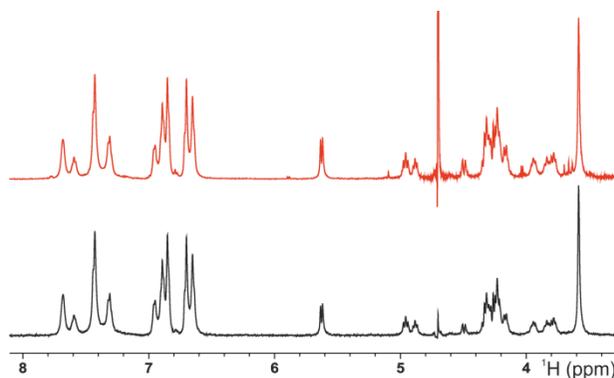
**Figura 4.3.2.1** Espectros monodimensionales obtenidos a diferentes relaciones proteína-ligando para el complejo formado con el disacárido **11**.

Se llevó a cabo un experimento NOESY transferido para determinar la estructura del ligando enlazado (**figura 4.3.2.2**) con una relación de 1:60 proteína-disacárido. Este espectro confirmó, por los NOEs interresiduales e interglucosídicos obtenidos, que la estructura del ligando enlazado y del libre eran similares, con una conformación de  $^4\text{C}_1$  para ambos anillos y un enlace glucosídico syn- $\Psi$ , es decir, una estructura lineal. Además, se repitió ese experimento a diferentes tiempos de mezcla para medir las distancias experimentales entre los hidrógenos representativos de la conformación anular.



**Figura 4.3.2.2** Espectro bidimensional NOESY obtenido a 200 ms a 298K para el complejo formado con el disacárido **11**.

Después se llevaron a cabo los experimentos de STD (**figura 4.3.2.3**) a diferentes tiempos de irradiación (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 s) y con una relación 1:90 para obtener la curva de crecimiento del STD y analizar la orientación del disacárido cuando está enlazado a la proteína. En este caso se observa en el espectro  $^1\text{H}$ -RMN de referencia (rojo) es prácticamente similar al espectro de diferencia  $^1\text{H}$ -STD (negro) lo que confirma que a todos los protones del disacárido le llega saturación de la proteína indicando un modo de unión lineal.



**Figura 4.3.2.3** Espectros de los experimentos de STD obtenidos a 298K para el complejo formado con el disacárido **11**. La intensidad de los espectros no es real, el espectro de STD está ampliado con respecto al RMN.

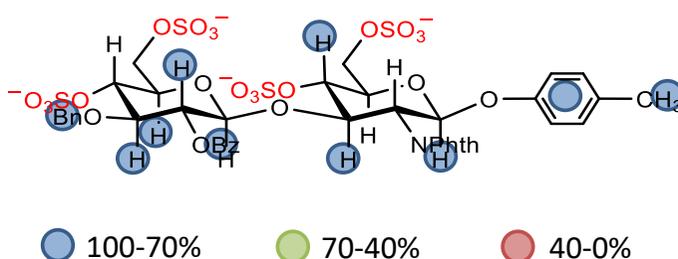
Para confirmar el modo de unión se midieron los valores de  $\text{STD}_0$  absolutos y relativos (**tabla 4.3.2.1**). Dichos valores,  $\text{STD}_0$  absolutos, son bastantes altos indicando una gran interacción del disacárido con la proteína. Estos valores se han conseguido al realizar los experimentos con una relación entre la proteína y el disacárido alta confirmando una

buena condición de equilibrio y una concentración disacárido en disolución suficiente para poder medir el porcentaje de STD.

STD <sub>0</sub> abs./rel		STD <sub>0</sub> abs./rel	
H1A	8.1/84	H2B	8.3/86
H3A	7.3/76	H3B	7.3/75
H4A	7.9/92	H5B	7.7/80
H6A	8.6/	H6B	8.4/87
Bz	9.4/98	Bn	9.4/97
CH3-OMP	9.5/99	OMP	9.7/100

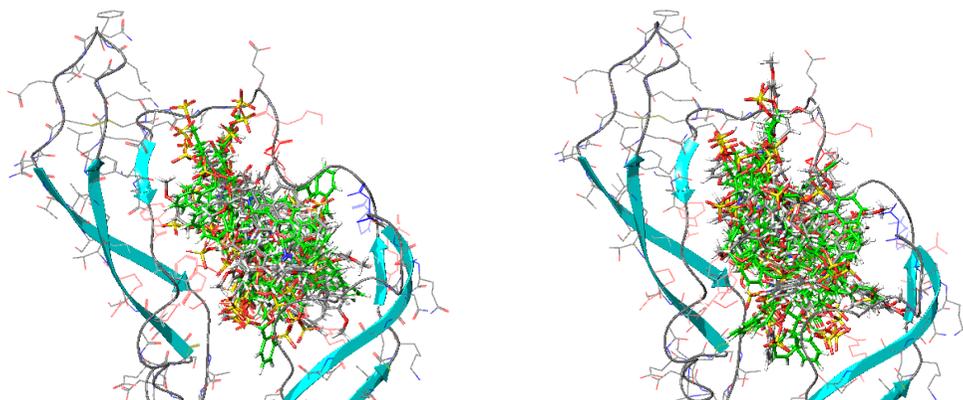
**Tabla 4.3.2.1** Valores de STD<sub>0</sub> absolutos y relativos medidos para el complejo formado con el disacárido **11**.

Además, se ha representado el mapa del epítipo para determinar el modo de unión del complejo a partir del porcentaje de saturación que le llega al ligando desde la proteína (**figura 4.3.2.4**). Como se puede apreciar en el mapa del epítipo de dicho disacárido el rango de saturación para los protones medidos está comprendido entre un 70 y 100% no predominando ese rango tan alto para uno de los anillos, sino en los dos. Esto indica que el modo en el que se orienta el disacárido en el complejo es entre los dos dominios de la Midkina llegándole bastante saturación por ambos lados del disacárido.



**Figura 4.3.2.4** Mapa del epítipo obtenido para el complejo formado con el disacárido **11** obtenido a partir de la curva de crecimiento del STD a 298K.

Se llevó a cabo un docking para el complejo con precisión simple (**figura 4.3.2.5 izquierda**) y con las 10 estructuras de menor energía obtenidas se realizó un docking extra preciso (**figura 4.3.2.5 derecha**). Se han representado todas las estructuras obtenidas en ambos casos. Y, como es lógico, aunque se observan las estructuras del disacárido en el mismo sitio entre los dos dominios de la proteína, no se ha obtenido en el docking una única estructura indicativa de un modo de unión, sino que el resultado del docking representa varias estructuras indicando varias orientaciones del disacárido en el interior de la proteína.

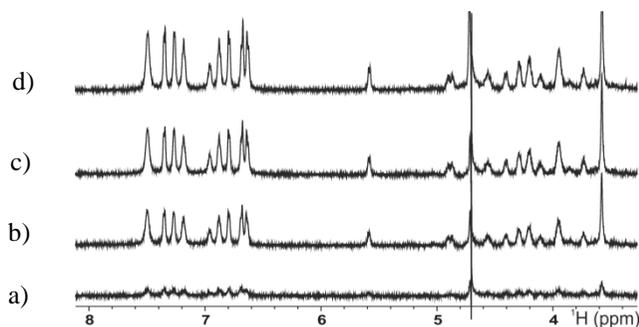


**Figura 4.3.2.5** Representación de las estructuras obtenidas para el complejo con el disacárido **11** en un docking simple (izquierda) y extra preciso (derecha). Se han representado todas las estructuras obtenidas para el complejo.

#### 4.3.2.2 Complejo formado por el disacárido **12**.

Este disacárido presenta una secuencia disacárido GlcN-Glc con 3 grupos  $\text{SO}_3^-$ , dos en el anillo de Glc y 1 en el anillo de GlcN. Al igual que para el complejo anterior se tuvieron que preparar diferentes muestras para evitar el posible agregado cuando el disacárido se encuentra libre y obtener un equilibrio con condiciones apropiadas para poder medir porcentajes de STD. Para cada muestra preparada con diferente relación proteína-ligando se realizó un espectro  $^1\text{H}$ -RMN (**figura 4.3.2.6**). La concentración de proteína para todas las muestras preparadas varió de 8.3 a 2.5  $\mu\text{M}$  hasta obtener la relación óptima (1:60, 1:120, 1:150 y 1:200) manteniendo constante la concentración del ligando a 500  $\mu\text{M}$ . El espectro a (inferior) refleja una relación pequeña, 1:60, donde prácticamente no se observan las señales del esqueleto del disacárido ya que hay poca concentración de ligando comparado con la proteína. Al ampliar la relación al doble (1:120), espectro b, se disminuye a la mitad la concentración de proteína dejando más libre el ligando en el equilibrio por lo que a esta relación sí se observan señales para el

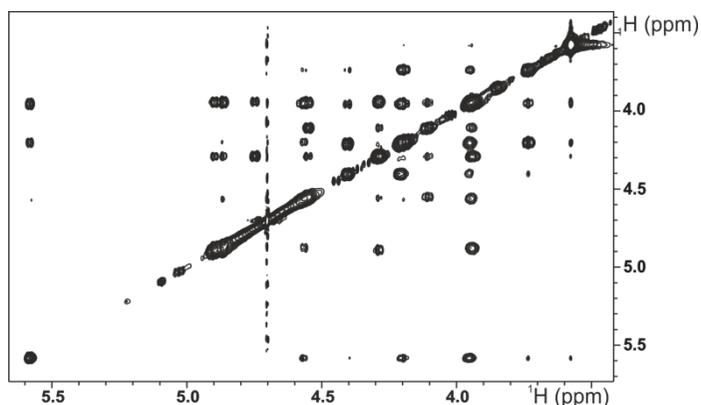
ligando. Con una relación 1:150 se aumenta la señal/ruido del espectro y a partir de 1:150 no se observan diferencias significativas con la siguiente relación, 1:200. A esta relación las señales del ligando, ya resueltas, continúan siendo ligeramente anchas debido a la participación del disacárido complejado en equilibrio con el libre, aumentando el tiempo de correlación promedio con respecto al ligando libre y no porque se forme un agregado en su forma libre.



**Figura 4.3.2.6** Representación de los espectros monodimensionales obtenidos para el complejo formado por el disacárido **12** y la Midkina variando la relación entre ellos desde 1:60 (a), 1:120 (b), 1:150 (c) y 1:200 (d). Todos los experimentos se realizaron con los mismos escanes manteniendo la intensidad de los espectros originales.

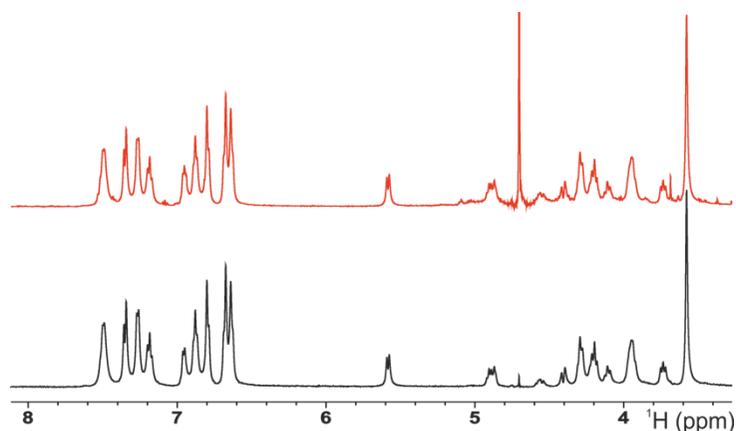
Con la última muestra con una relación (1:200) se realizaron el resto de experimentos de caracterización del complejo, tanto el NOESY transferido (**figura 4.3.2.7**) como los experimentos de STD (**figura 4.3.2.8**).

El experimento NOESY transferido refleja una gran cantidad de picos NOEs del disacárido de estudio y ellos reflejan una conformación  ${}^4C_1$  para los dos anillos. Además, se observa el NOE del enlace glicosídico mostrando una estructura lineal. Los NOEs obtenidos son similares a los del ligando libre mostrando la misma conformación del disacárido en presencia o no de proteína. Esto muestra gran información acerca de la estabilidad del disacárido estudiado.



**Figura 4.3.2.7** Espectro bidimensional NOESY transferido obtenido a 200 ms y 298K para el complejo formado entre el disacárido **12** y la Midkina.

El espectro de STD obtenido a 4 s de saturación se representa en la siguiente figura. Ambos espectros, el de referencia (rojo) y el de diferencia (negro) muestran gran similitud indicando que a todos los protones de los protones le llega saturación desde la proteína indicando que el ligando debe de orientarse al igual que el anterior en el interior de la proteína, entre los dos dominios.



**Figura 4.3.2.8** Representación de un experimento de STD a 298K y 4 s de saturación. El espectro de referencia (rojo) y el espectro de diferencia (negro) obtenidos para el complejo formado por el disacárido **12** y la Midkina.

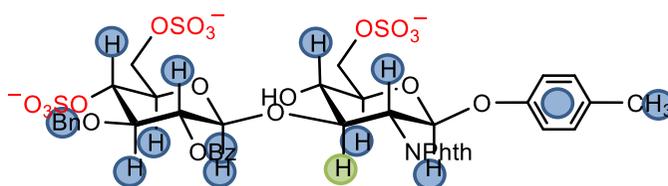
Un análisis más exhaustivo de la estructura del complejo se obtuvo mediante los valores medidos de STD<sub>0</sub> absolutos y relativos (**tabla 4.3.2.2**). Estos valores indican una gran interacción entre la proteína y el ligando ya que son muy altos comparados con los obtenidos hasta ahora para los complejos estudiados con la Midkina. Esto puede sugerir

que además del complejo formado con la proteína también se produce un agregado cuando el ligando está libre. Los experimentos realizados para el complejo fueron a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  de ligando ya que por los estudios realizados del ligando libre presentados en el apartado 4.3.2 a esa concentración no se producía ningún tipo de agregado. Por lo tanto, lo que se puede suponer que la gran saturación recibida por el ligando es totalmente de la proteína estando en unas condiciones de equilibrio bastante buenas para poder medir porcentajes de STD. Debido a que las condiciones entre los complejos estudiados con los disacáridos y la Midkina son totalmente diferentes no se pueden comparar los valores de  $\text{STD}_0$  medidos.

	STD <sub>0</sub> abs./rel.		STD <sub>0</sub> abs./rel.
H1A	9.1/76	H1B	9.9/83
H2A	9.6/80	H2B	8.7/72
H3A	11.6/96	H3B	9.1/76*
H4A	8.6/72	H4B	8.8/73
H5A	9.1/76*	H5B	9.1/76*
H6A	9.0/75	H6B	9.2/76
CH <sub>3</sub> -OMP	11.1/92	OMP	10.4/86
Bn	10.5/87	Bz	9.9/83

**Tabla 4.3.2.2** Valores de  $\text{STD}_0$  absolutos y relativos medidos a 298K para el complejo formado por la Midkina y el disacárido **12**.

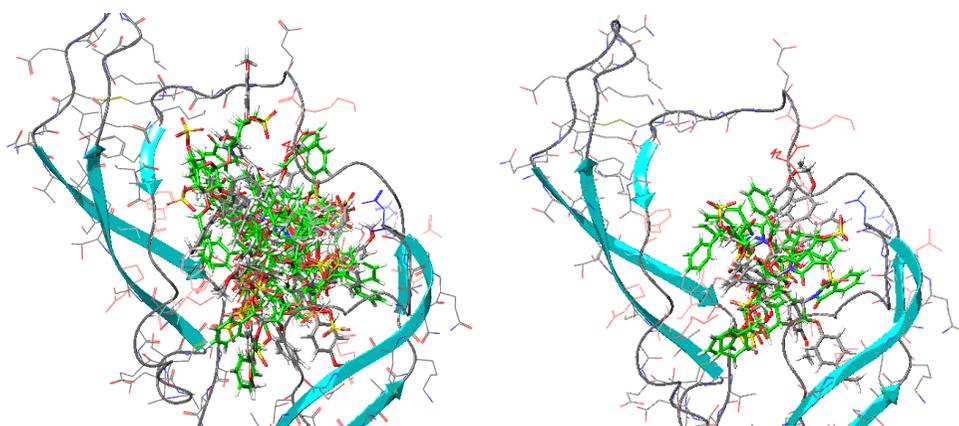
El mapa del epítopo (**figura 4.3.2.9**) para este disacárido muestra un rango de saturación (70-100%) similar para todos los hidrógenos del esqueleto del disacárido y para todos los anillos aromáticos presentes en el indicando un modo de unión lineal del disacárido y la proteína al igual que el complejo disacárido estudiado anteriormente.





**Figura 4.3.2.9** Representación del mapa del epítipo obtenido de los experimentos de STD a 298K para el complejo formado con el disacárido **12** y la Midkina.

La **figura 4.3.2.10** muestra las dos estructuras del complejo formado con el disacárido **12** y la Midkina obtenidas mediante un docking simple (izquierda) y un docking con precisión extra (derecha). Se han representado todas las estructuras obtenidas en ambos casos y como se puede apreciar se obtuvieron menos estructuras para el docking XP que en el caso anterior. A pesar de eso, no se observa una única estructura predominante ya que el disacárido muestra diferentes orientaciones dentro del complejo, las cuales no pueden ser ni ratificadas ni descartadas por los datos experimentales.

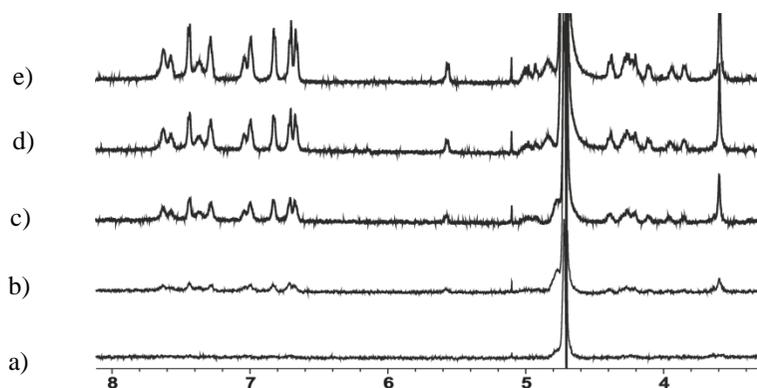


**Figura 4.3.2.10** Representación del complejo formado por el disacárido **12** y la Midkina obtenida mediante docking, SP (izquierda) XP (derecha).

#### 4.3.2.3 Complejo formado con el disacárido **13**.

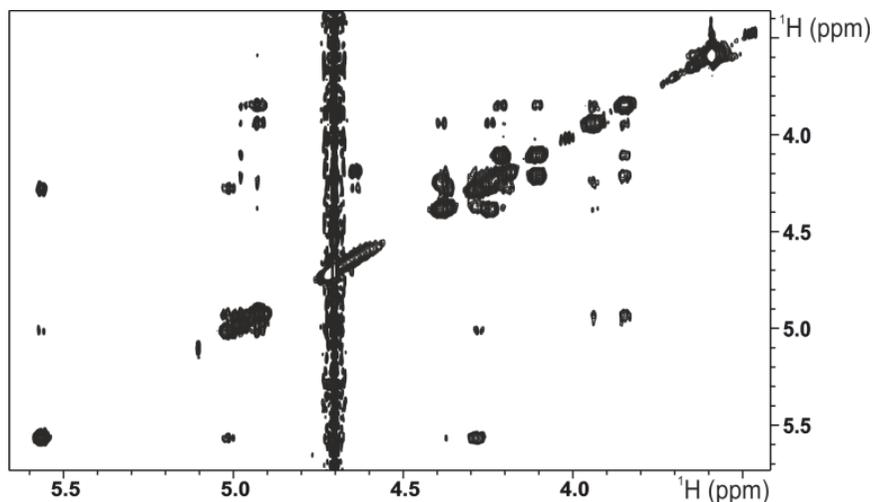
Este disacárido presenta la misma secuencia que los dos anteriores con la diferencia del patrón de sulfatación. En este caso sólo presenta dos grupos sulfatos en el anillo GlcN y ninguno en el Glc. El procedimiento para la obtención de las condiciones apropiadas para los experimentos de STD fue ir aumentando la relación proteína-ligando hasta obtener espectros donde la señal/ruido reflejase un equilibrio entre las características del ligando enlazado y libre. Se comenzó con una relación 1:60 pero en este caso se decidió partir de concentraciones de proteína y de ligando muy bajas, 5  $\mu$ M y 300  $\mu$ M

respectivamente. Se decidió disminuir la concentración antes de empezar debido a que según el estudio realizado anteriormente del ligando libre a baja concentración (500  $\mu\text{M}$ ) presentaba agregado. Así se esperaba que en la muestra no hubieran efectos de ensanchamiento de señales por agregación del ligando y que de darse solo fuera por el cambio en el tiempo de correlación promedio. El espectro obtenido con esa relación de proteína ligando es el a de **figura 4.3.2.11**. En este caso no es posible ni la visualización de los hidrógenos de los anillos aromáticos que debido a la diferencia de relajación con los hidrógenos de los anillos de carbohidrato se obtienen más rápidamente en los espectros. El espectro b de la misma figura se obtuvo con una relación 1:120 manteniendo constante la concentración de ligando pero tampoco se observa ninguna señal de los hidrógenos de los anillos del esqueleto disacáridico aunque sí parece que aparecen señales de los anillos aromáticos. Por lo tanto, se decidió aumentar la relación de la misma forma que antes y con una relación 1:180 (espectro c) se observan más señales para el disacárido aunque poco intensas y muy anchas. Se volvió a aumentar la relación a 1:240 (espectro d) disminuyendo la proteína y se aprecia que aparecen señales de más intensidad que con las relaciones anteriores. Como se puede apreciar se va obteniendo un equilibrio entre la proteína y el ligando con buenas condiciones para tener un promedio de ambas especies. Esto puede ser comparado así debido a que todos los experimentos se realizaron en las mismas condiciones de tamaño de Fid y escanes. Por último, para comprobar que el ensanchamiento no se debe a que se produzca un agregado del ligando en su estado libre, se decidió aumentar la relación disminuyendo el disacárido obteniendo una relación 1:300 y una concentración de ligando de 125  $\mu\text{M}$  (espectro e). Con estas condiciones se obtuvo algo más de intensidad en las señales pero no son más definidas que en el caso anterior por lo que se decidió no seguir aumentando la relación proteína-ligando.



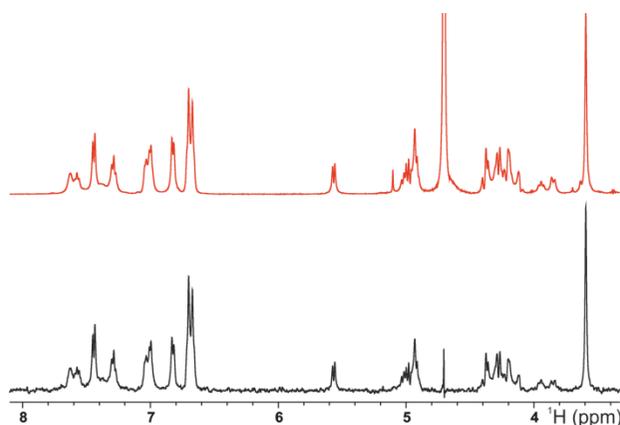
**Figura 4.3.2.11** Espectros obtenidos para el complejo formado con el disacárido **13** a diferentes relaciones proteína-ligando a 298K. El espectro a fue obtenido a una relación 1:60, el b a 1:120, el c a 1:180, el d a 1:240 y el e a 1:300 con 125  $\mu\text{M}$  de ligando.

Los experimentos NOESY transferido (**figura 4.3.2.12**) y de STD (**figura 4.3.2.13**) se llevaron a cabo con la proporción proteína-ligando óptima, 1:300. De los NOEs se puede obtener la conformación para los dos anillos del disacárido. Así se observa una estructura lineal con conformación  ${}^4C_1$  para los dos anillos ya que se observan los NOEs característicos de esa conformación.



**Figura 4.3.2.12** Espectro bidimensional NOESY obtenido a 200 ms para el complejo formado por la Midkina y el disacárido **13** a 298K.

Los espectros obtenidos de los experimentos de STD se muestran en la **figura 4.3.2.13** los cuales, tanto el de diferencia como el de referencia, muestran una gran similitud indicando de forma *cualitativa* una orientación lineal del ligando frente a la proteína ya que en el experimento de  ${}^1\text{H}$ -STD se observan todas las señales de los protones del disacárido.



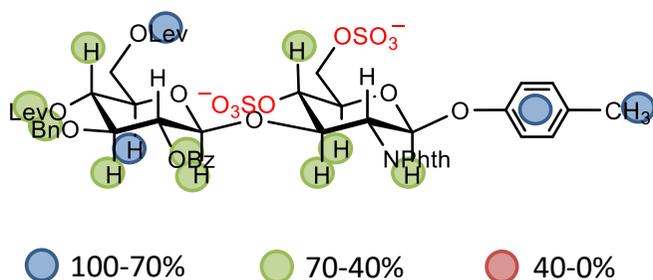
**Figura 4.3.2.13** Espectros monodimensionales obtenidos del experimento de STD a 4 s para el complejo formado entre la proteína y el disacárido **13** a 298K.

Se han medido los valores de STD<sub>0</sub> absolutos y relativos para el mismo complejo. Estos valores absolutos siguen siendo altos indicando unas condiciones de equilibrio proteína-ligando bueno.

	STD0 abs./rel.		STD0 abs./rel.
H1A	4.5/69	H1B	3.7/57*
H2A	4.6/71	H2B	4.0/63
H3A	4.3/67	H3B	4.0/61
H4A	4.4/67	H4B	4.0/62*
H5A	4.0/62	H5B	5.9/91
H6A	4.6/71	H6B	
CH <sub>3</sub> (OMP)	5.0/78	Ph (OMP)	4.8/75
Bn	3.9/60	Bz	4.5/70

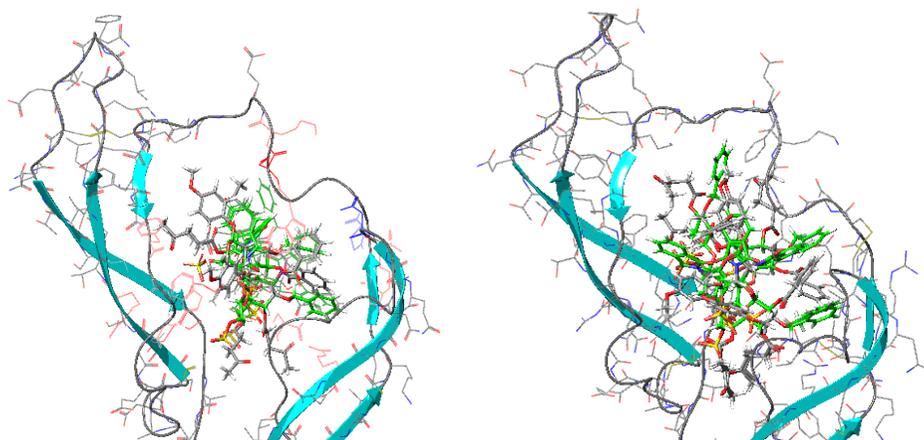
**Tabla 4.3.2.3** Valores de STD<sub>0</sub> absolutos y relativos obtenidos para el complejo formado con el disacárido **13** y la Midkina.

El mapa de epítipo para este disacárido presenta tal vez una orientación del ligando en la proteína diferente a los dos anteriores ya que no se observa un solo rango de 70 a 100% sino que predomina dos rangos diferentes, de 40 a 10% y de 70 a 100% mostrando valores más dispersos. El problema es que los valores no son lo suficientemente dispersos para deducir un modo de unión diferente para este disacárido aunque sí parece indicar una mayor interacción por el grupo OMP.



**Figura 4.3.2.14** Representación del mapa del epítipo obtenido para el complejo formado por el disacárido **13** y la Midkina.

Al igual que en los dos complejos estudiados anteriormente se realizó un docking con precisión simple y otro con precisión extra (**figura 4.3.2.15 izquierda y derecha**). En los dos casos, los resultados muestran pocas estructuras diferentes para el complejo formado restringiendo las posibilidades de orientación del ligando y las estructuras del complejo. A pesar de eso y con el mapa del epítipo algo diferente obtenido en este caso, no se pudo obtener un solo modo de unión entre la proteína y el ligando ya que el disacárido como el docking indica se orienta entre los dos dominios de la proteína de forma inespecífica.

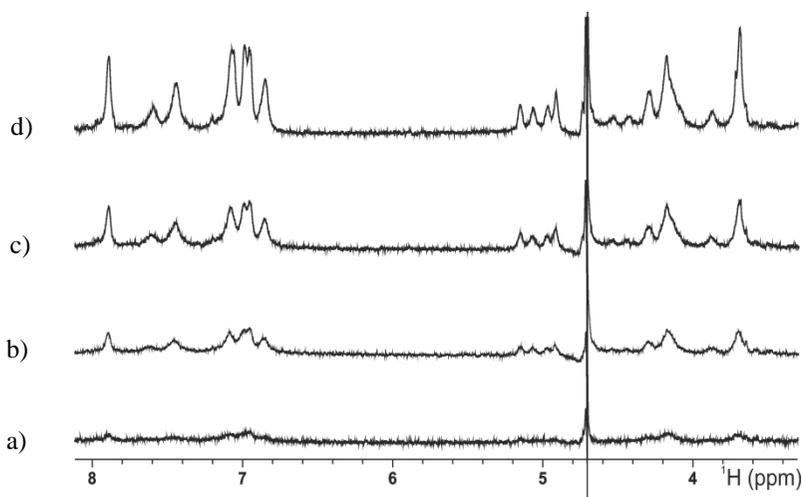


**Figura 4.3.2.15** Representación de las estructuras de docking obtenidas para el disacárido **13** y la Midkina a partir de un SP y un XP.

#### 4.3.2.4 Complejo formado por el disacárido **15**.

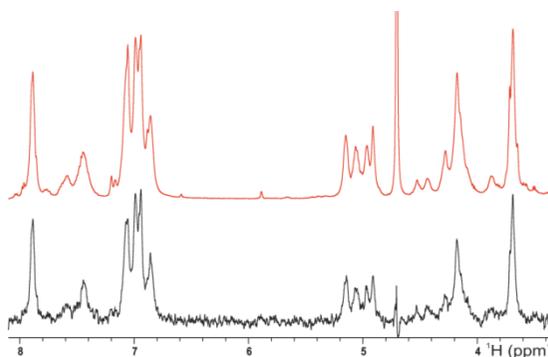
El disacárido **15** presenta una secuencia diferente a los demás complejos disacarídicos estudiados (GalN-Glc) sólo con dos grupos sulfato en el anillo de GalN en las mismas

posiciones que el disacárido **13**. Para la preparación de la muestra, con la cual se iban a realizar los experimentos de RMN, se siguió el mismo procedimiento que para los demás complejos partiendo de una concentración de ligando de 500  $\mu\text{M}$ . Las relaciones proteína-ligando de las muestras fueron: 1:60 (espectro a), 1:120 (espectro b), 1:180 (espectro c) y 1:300 (espectro d de la **figura 4.3.2.16**) manteniendo constante la concentración de ligando. Debido a que a esta concentración de proteína-ligando se obtenían señales del ligando libre aunque bastantes anchas se decidió utilizarla para la realización de los experimentos llevados a cabo para el estudio del complejo.



**Figura 4.3.2.16** Espectros monodimensionales obtenidos para el complejo formado por el disacárido **15** y la Midkina a 298K variando la relación entre ellos. El espectro a muestra una relación 1:60, el b 1:120, el c 1:180 y el d 1:300 manteniendo constante la concentración de ligando a 500  $\mu\text{M}$ .

Se realizaron los experimentos de STD (**figura 4.3.2.17**) a diferentes tiempos de saturación para obtener la curva de crecimiento del  $\text{STD}_0$ . En este caso, parece que las señales son más anchas que en los demás disacáridos lo que puede deberse a una mayor interacción proteína-ligando o a que no se realizaron los experimentos con la relación adecuada de proteína-ligando teniéndose que haber preparado una muestra con menos ligando para evitar el agregado. A pesar de eso, si se analiza el espectro  $^1\text{H}$ -STD (negro) se observa como todos los protones del ligando reciben saturación de la proteína.



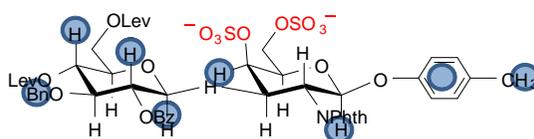
**Figura 4.3.2.17** Espectro de referencia (rojo) y de diferencia (negro) a 4 s de saturación para el complejo formado por el disacárido **15** y la Midkina.

Los valores de  $STD_0$  tanto absolutos como relativos medidos para el complejo se muestran en la **tabla 4.3.2.4**. Como se puede apreciar debido al gran solapamiento de las señales bien por la formación del complejo o algún agregado del ligando libre se obtienen muy pocos valores de  $STD_0$  los cuales están de acuerdo con los demás complejos disacarídicos.

	STD0 abs./rel.		STD0 abs./rel.
H1A	4.0/100*	H2B	3.5/87
H4A	3.0/75	H4B	4.0/100*
CH <sub>3</sub> (OMP)	3.7/93	Ph (OMP)	3.9/99
Bn	2.8/72	Bz	3.7/94

**Tabla 4.3.2.4** Valores de  $STD_0$  absolutos y relativos medidos para el complejo formado por el disacárido **15** y la Midkina.

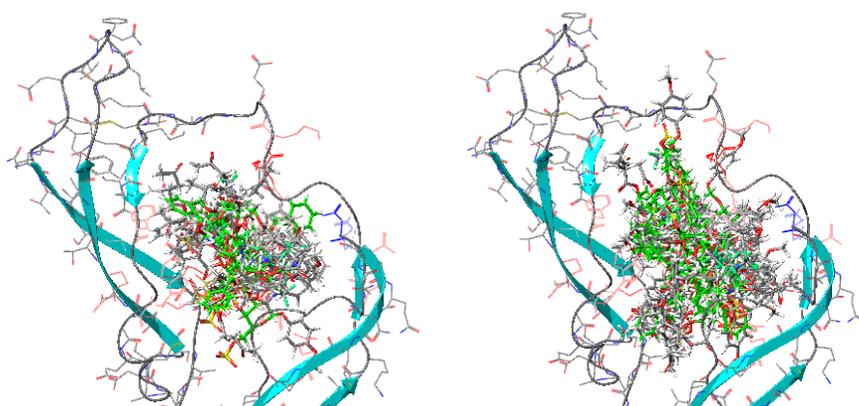
El mapa del epítipo para este complejo puede indicar un modo de unión lineal del ligando dentro de la proteína ya que aunque se obtienen muy pocos valores de  $STD$  y todos en el mismo rango (70-100%) se han podido medir en ambas caras del disacárido (**figura 4.3.2.18**).





**Figura 4.3.2.18** Mapa del epítipo para el complejo formado por el disacárido **15** y la Midkina.

Al igual que para los demás complejos, para este último también se llevó a cabo un docking con simple y extra precisión (**figura 4.3.2.19**). En las dos estructuras de los complejos obtenidas se han representado todas las estructuras del disacárido obtenidas. Como es lógico, no se observa ninguna estructura predominante ya que el disacárido muestra diferentes orientaciones dentro del complejo.



**Figura 4.3.2.19** Estructuras del complejo formado entre la Midkina y el disacárido **15** obtenidas a partir de un docking SP y XP.

Después del análisis del estudio realizado tanto de forma experimental (RMN) como teórica (docking) para todos los complejos disacáridicos no se ha podido determinar un único modo de unión. A pesar de eso, sí se conoce la estructura de los disacáridos **11**, **12** y **13** de secuencia GlcN-Glc cuando forma parte del complejo y que los diferentes ligandos interaccionan con la Midkina de forma lineal entre sus dos dominios, al igual que los tetrasacáridos, obteniendo unos valores de constantes de disociación de bajo  $\mu\text{M}$ . Además, se ha puesto de manifiesto la importancia de los grupos sulfato en la interacción ya que se ha tenido que cambiar la relación proteína-ligando para obtener ambas especies en equilibrio y en la propia naturaleza del disacárido ya que se ha tenido que cambiar las concentraciones de los ligandos libres para poder obtener espectros que no reflejasen la producción de ningún agregado.

### 4.3.3 Datos de inhibición obtenidos por polarización de fluorescencia.

Al igual que para los tetrasacáridos se han medido los porcentajes de inhibición para los 5 disacáridos (**tabla 4.3.3.1**) mediante Polarización de Fluorescencia. Los valores están de acuerdo con los obtenidos para los tetrasacáridos en el rango de bajo  $\mu\text{M}$  presentando estos valores un rango menos amplio. Además, debido al rango tan amplio que presentan los complejos formados por los tetrasacáridos, estos valores se encontrarían dentro de ese rango siendo más semejantes a los tetrasacáridos dibencilados indicando una inhibición de la proteína al 50% de su concentración similar a ellos. De forma general en función de su  $\text{IC}_{50}$  se pueden ordenar con valores más grandes (menos interacción) los tetrasacáridos libres y más pequeños los tetrasacáridos persustituidos (más interacción). Son lógicos esta ordenación de forma general ya que los disacáridos presentan grupos aromáticos al igual que los tetrasacáridos dibencilados que pueden producir interacciones hidrofóbicas aromático-aromático con la proteína ( $\pi$ - $\pi$ ) y/u otro tipo de interacciones como  $\pi$ -stacking.

Disacárido	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
11	44
12	85
13	28
14	30
15	17

Valores de  $\text{IC}_{50}$  obtenidos a 25  $\mu\text{M}$  de concentración de proteína por Polarización de Fluorescencia.

## 4.4 CONCLUSIONES.

Primero, se van a mencionar las conclusiones para el estudio realizado para los tetrasacáridos libres y complejados.

- Después del estudio de la estructura molecular tanto en la conformación de los anillos como de la flexibilidad molecular de los tetrasacáridos en su forma libre se ha llegado a concluir que la conformación experimental para todos los anillos de GlcNAc y de GlcA es 4C1. Sin embargo, el anillo de IdoA en el tetrasacárido 1 presenta una conformacional mayoritaria 2SO deducida por el NOE exclusivo entre H2 y H5 y por las 3JHH intermedias. Se han determinado los ángulos interglicosídicos que son compatibles con conformaciones lineales con uniones tipo  $\text{syn-}\Psi$ . Todas las conclusiones obtenidas experimentalmente han sido confirmadas con los datos obtenidos de las DM con restricciones promediadas en el tiempo. Siendo crucial para el

análisis teórico el uso de estas DM ya que las libres no reproducían los resultados experimentales para los anillos de GlcA en presencia de grupos hidrofóbicos. Además, ha quedado claro la mayor flexibilidad de los anillos de GlcA extremos que los intermedios según las DM libres. Esta incompatibilidad entre los resultados experimentales y los teóricos obtenidos de las DMs libres en presencia de grupos hidrofóbicos se puede deber a que ni los grupos bencilos ni benzoatos están parametrizados para Glycam y se han tenido que construir a partir de Amber con los módulos Antechamber y Parmchk para llevar acabo las DMs.

2. La poca solubilidad y la gran agregación entre los tetrasacáridos perprotegidos en disolución acuosa han repercutido en los datos experimentales ya que no se han podido obtener datos con claridad siendo bastante difícil trabajar con esas muestras. Incluso para el tetrasacárido que presenta la relación grupos sulfatos/anillos hidrofóbicos más pequeña no se ha podido realizar ni el análisis *cualitativo*.

3. La conformación de los tetrasacáridos en su forma enlazada y libre son iguales y compatibles con una estructura tridimensional lineal.

4. La interacción de cada uno de los tetrasacáridos con la Midkina es diferente ya que se puede observar que para obtener un mapa de epítipo con valores medibles de  $STD_0$  se ha tenido que cambiar las relaciones proteína-ligando para los productos bencilados. Esto está de acuerdo con los valores de  $IC_{50}$ .

5. El mapa del epítipo de los tetrasacáridos muestra un modo de unión lineal entre los dos dominios de la proteína tanto de los productos dibencilados como sin bencilar.

6. Mediante el docking molecular se han obtenido las estructuras de los tetrasacáridos entre los dos dominios de la proteína pero debido a que el mapa de epítipo no indica ningún modo de unión diferente al lineal no se ha podido distinguir ninguna de las estructuras obtenidas como la estructura que forma el complejo.

7. El aumento de afinidad entre los tetrasacáridos y la proteína debido a que no cambia el modo de unión ni la estructura tridimensional del ligando libre se debe al aumento de residuos hidrofóbicos presente en los tetrasacáridos que producen una interacción con los aminoácidos de la proteína, además de la interacción electrostática ya conocida de los grupos cargados.

Las conclusiones para los disacáridos tanto en su forma libre como en su forma complejada son bastantes parecidas a las de los tetrasacáridos de CS e híbridos:

1. Al cambiar la relación entre grupos sulfato/grupos hidrofóbicos de los disacáridos es más acusado el hecho de la agregación hasta tal punto que a concentraciones normales ha sido imposible la realización del análisis cualitativo de la estructura libre (disacárido **14**). Cuando los disacáridos presentan más grupos aromáticos este efecto es más acusado. Si se compara el disacárido **15** con su correspondiente pentasacárido se observa como al aumentar la longitud y por lo tanto, aumentar los grupos sulfato, se produce el aumento de la solubilidad, la disminución del agregado y a concentraciones normales de trabajo se puede determinar una estructura tridimensional bastante fiable.

2. Con las condiciones de muestras adecuadas el análisis cualitativo reveló que la secuencia disacáridica es lineal y la conformación de los anillos es  ${}^4C_1$  como era de esperar, igual que para el pentasacárido. Debido a los escasos valores cuantitativos no se han podido llegar a cabo las DM con restricciones promediadas en el tiempo para complementar los valores experimentales y obtener una estructura teórica. Los resultados de la DM libres reproducen mejor los datos experimentales cuando los disacáridos presentan un anillo con grupos sulfato y el otro anillo sin ninguno independientemente de la secuencia. Este efecto se puede explicar debido a una inestabilidad de las cargas. Aunque reproduce la conformación mayoritaria de los anillos no reproduce la linealidad estructural con un único mínimo energético en la trayectoria ( $\Phi/\Psi$ ).

3. Después de los valores de  $STD_0$  obtenidos para cada disacárido no se observan diferencias en el modo de unión de los disacáridos con la Midkina ya que se orientan entre ambos dominios de la Midkina. Sí es evidente que al presentar una secuencia diferente a los tetrasacáridos y una longitud más pequeña la interacción es más pequeña que para los tetrasacáridos perprotegidos pero más alta que los desprotegidos.

4. La realización del docking molecular llevado a cabo con las mismas condiciones de grid y de docking que los tetrasacáridos confirma las diferentes estructuras obtenidas las cuáles no indican un único modo de unión con la Midkina.

## 4.5 PARTE EXPERIMENTAL.

Los experimentos llevados a cabo en el estudio de los complejos formados por los tetrasacáridos con la MKN y los tetrasacáridos en su forma libre junto con los disacáridos han sido prácticamente los mismos. Los experimentos de RMN fueron llevados a cabo en un BRUKER 600 y 700 MHz AVANCE III HD con un imán ASCEND equipado con una criosonda QCI S3 H/F-C/N-D 05-Z. El espectrómetro de 700 MHz pertenece al Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

### 4.5.1 Estudio de los tetrasacáridos libres mediante RMN.

Las muestras se prepararon en tubos estándar, 5mm, a concentraciones de 1 mM en 500  $\mu$ L de buffer 1xPBS, salvo que se indique lo contrario.

Los tetrasacáridos libres se asignaron mediante experimentos bidimensionales DQF-COSY, TOCSY y NOESY y correlaciones HSQC. Los experimentos homonucleares se realizaron con las versiones sensibles a la fase, con selección por gradientes de la magnetización de la biblioteca de Bruker siempre que fuese posible. En los experimentos TOCSY se empleó DIPSY-2 como secuencia de mezcla y en los NOESY se aplicó un filtro para la supresión de los artefactos de cero cuanto consistente en un pulso con barrido de frecuencias de  $180^\circ$  con un gradiente simultáneo<sup>16</sup> junto con un pulso de  $180^\circ$  flanqueado por gradientes de campo para desfase de la magnetización no deseada.<sup>17,18</sup> En algunos casos se emplearon las versiones monodimensionales de los experimentos NOESY por selección con *DPFGSE* (*del inglés, double pulsed gradient spin echo*) y seguido por la secuencia de mezcla correspondiente.<sup>19,20,21</sup> La secuencia de

---

<sup>16</sup> M. J. Thrippleton, J. Keeler, *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *115*, 4068.

<sup>17</sup> R. Wagner, S. Berger, *Journal of Magnetic Resonance* **1996**, *123 A*, 119.

<sup>18</sup> J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*, 4546.

<sup>19</sup> J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler, A. J. Shaka, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 6037.

<sup>20</sup> H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger, W. Bermel, *Journal of Magnetic Resonance* **1986**, *70*, 106.

<sup>21</sup> K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.L. Hwang, A.J. Shaka, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 4 199.

correlación  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  más usada fue la correspondiente al HSQC con mejora de la sensibilidad mediante doble transferencia inept, sensible a la fase usando un esquema eco/antieco-TPPI del ciclo de fases con selección por gradientes y pulsos adiabáticos en todos los  $180^\circ$  de  $^{13}\text{C}$ .<sup>22,23,24</sup> Cuando fue necesario se realizaron experimentos selectivos 1D-TOCSY y 1D-NOESY, empleando la selección mediante DPGFSE. Cuando fue necesario se efectuaron doble selección tanto en  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .<sup>25,26,27</sup> En el caso del experimento homonuclear cada par de gradientes que flanquean el pulso selectivo de reenfoque (gaussiano de  $180^\circ$  con una longitud de 20-40 ms) tienen intensidades no relacionadas por números enteros para evitar reenfoques de coherencias no deseadas. En general se emplearon para los 1D-TOCSY de 48 a 128 acumulaciones de fides de 16 k puntos y para los experimentos de doble selección 256 – 512 acumulaciones de 16 k siendo el tiempo de mezcla para el NOESY de 500 ms.

Las adquisiciones de los DQF-COSY se realizaron a 600 y 700 MHz usando entre 1024 y 512 incrementos de 4096-2048 puntos y entre 2 y 16 acumulaciones para cada uno a 313-290K. Para los experimentos TOCSY, registrados a 600 y 700 MHz se emplearon 450 – 512 incrementos en t1 de 2048 puntos y 8-16 barridos entre 313 y 298 K. Los experimentos NOESY, se registraron con 512 incrementos de 2048 puntos y entre 8 y 16 acumulaciones a temperaturas comprendidas entre 313 y 298 K. Cuando sólo se trataba de un experimento para caracterizar cualitativamente la conformación o confirmar la asignación se empleó un único tiempo de mezcla, habitualmente 500 ms. Las curvas de crecimiento para la cuantificación de distancias se construyeron mediante experimentos consecutivos donde únicamente se variaban los tiempos de mezcla, manteniendo el resto de los parámetros constantes. Típicamente se emplearon 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 ms de tiempo de mezcla. Los experimentos HSQC se realizaron empleando entre 64 y 128 incrementos de 2048 puntos y 8 o 16

---

<sup>22</sup> A. G. Palmer III, J. Cavanagh, P. E. Wright, M. Rance, *Journal of Magnetic Resonance* **1991**, 93, 151.

<sup>23</sup> L. E. Kay, P. Keifer, T. Saarinen, *Journal of American Chemical Society* **1992**, 114, 10663.

<sup>24</sup> J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S. J. Glaser, O. W. Sorensen, C. Griesinger, *Journal of Biomolecular NMR* **1994**, 4, 301.

<sup>25</sup> H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger, W. Bermel, *Journal of Magnetic Resonance* **1986**, 70, 106.

<sup>27</sup> K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T. L. Hwang, A.J. Shaka, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 4 199.

acumulaciones a 313 – 281 K y a 700 o 600MHz. A todos ellos se aplicó predicción lineal en la dimensión indirecta empleando el software del constructor.

Para los compuestos **9** y **6** se variaron las condiciones experimentales debido a que los espectros indicaban agregación. Así, para **9**, se registraron espectros a 1.5 mM, 500, 250 y 125  $\mu$ M de ligando a diferentes temperaturas en PBS con un 5% de DMSO a 298, 308 y 313K. Para la asignación se realizaron DQF-COSY, TOCSY, NOESY y HSQC a 313K y a 1.5 mM, 250  $\mu$ M y se disminuyó la concentración hasta 125  $\mu$ M comprobando por  $^1\text{H}$ -RMN el ancho de las líneas. También se realizaron experimentos de  $^{19}\text{F}$ -RMN con desacoplamiento CPD a 298K. Dichos experimentos de  $^{19}\text{F}$  se repitieron se repitieron a 0, 1, 10 y 30 días de la preparación de la muestra.

#### 4.5.2 Estudio de los tetrasacáridos complejados mediante RMN.

Las relaciones entre la proteína y el ligando fueron de 1:50, 1mM de tetrasacárido y 20  $\mu$ M de proteína en 250  $\mu$ L de buffer 1xPBS, a no ser que se indique otra relación.

Experimentos de STD se adquirieron empleando las secuencias de la librería de pulsos del fabricante del equipo. Salvo que se especifique lo contrario, se usó una secuencia con saturación durante el tiempo de relajación mediante un tren de pulsos gaussianos de baja potencia de 49 – 50 ms de longitud separados por un intervalo de 1ms, precedido por un módulo de purga para eliminar magnetización residual del escan previo. Tras el módulo de excitación se destruye la magnetización residual de la proteína con un bloqueo de espines. Finalmente cuando fue necesario se aplicó supresión del disolvente por “*excitación sculpting*”.<sup>28,29,30</sup> Todos los experimentos fueron llevados a cabo irradiando a 0.7 y 40 ppm. Los tiempos de saturación habituales fueron 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 s. Los experimentos *on* y *off resonance* se adquirieron en escanes alternos y almacenaron independientemente. Los experimentos NOESY transferido se registraron usando la misma secuencia de pulsos que sobre el ligando libre. Se realizaron series de experimentos consecutivos en los que se varió el tiempo de mezcla entre 50 y 800 ms.

---

<sup>28</sup> M. Mayer, B. Meyer, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, 38, 1784.

<sup>29</sup> M. Mayer, B. Meyer, *Angewandte Chemie* **1999**, 111, 1902.

<sup>30</sup> T.L. Hwang, A.J. Shaka, *Journal of Magnetic Resonance* **1995**, 112 A, 275.

### 4.5.3 Estudio de los disacáridos libres mediante RMN.

Los disacáridos fueron estudiados en su forma libre mediante los mismos experimentos que los tetrasacáridos, 2D-HSQC, 2D-COSY, 2D-TOCSY y 2D-NOESY (ver apartado 4.5.1). Todos los experimentos se realizaron en el espectrómetro de 600 MHz.

Las adquisiciones de los experimentos DQF-COSY y TOCSY se realizaron usando 512 incrementos de 2048 puntos y entre 8 acumulaciones para cada uno. Los experimentos NOESY, se registraron con 256 incrementos de 2048 puntos y 16 acumulaciones. Cuando sólo se trataba de un experimento para caracterizar cualitativamente la conformación o confirmar la asignación se empleó un único tiempo de mezcla, habitualmente 500 ms. Las curvas de crecimiento para la cuantificación de distancias se construyeron mediante experimentos consecutivos donde únicamente se variaban los tiempos de mezcla, manteniendo el resto de los parámetros constantes. Típicamente se emplearon 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 ms de tiempo de mezcla.

Todos los compuestos se estudiaron a en 200  $\mu$ L de PBS usando tubos de 3 mm a 1.5 mM para los disacáridos **11**, **12**, **13** y **15**, a 500  $\mu$ M para el **12** y **13**, a 250  $\mu$ M para el **13**, a 125  $\mu$ M para el **13**, **14** y **15** utilizando DMSO como codisolvente cuanto fuese necesario.

El pentasacárido **16**, se analizó mediante experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN con presaturación a 298K, 2D-HSQC (128 incrementos y 16 acumulaciones por incremento), 2D-TOCSY (512 incrementos y 16 acumulaciones por incremento) y 2D-COSY (512 incrementos de fides y 16 acumulaciones por incremento) y para la curva de crecimiento del NOE se usaron tiempo de mezcla de 300, 350, 400, 450 y 500 ms en NOESYs con 256 incrementos y 16 escanes cada uno. La muestra se preparó por disolución del pentasacárido en 250  $\mu$ M de 1xPBS a 1 mM.

### 4.5.4 Estudio de los disacáridos complejados mediante RMN.

Condiciones de los experimentos llevados a cabo para cada uno de los complejos formados por los disacáridos y la Midkina. Los experimentos realizados para la obtención de datos de la asociación del ligando a la proteína fueron STD y NOESY transferido en todos los casos usando el mismo programa de pulsos que para los tetrasacáridos. La frecuencias de irradiación del STD fueron de 0.7 y 40 ppm.

En este caso hubo que optimizar la relación ligando proteína para disgregar los agregados que originaban espectros con señales anchas de los que no se puede extraer información sobre el ligando dentro del complejo. A partir de aquí sólo se describen las condiciones de los experimentos que fueron satisfactorios

- Complejo formado con el disacárido **11**. Se registraron dos curvas de crecimiento de NOE, con relación proteína-ligando 1:60 y 1:90 manteniendo la concentración de proteína a 20  $\mu$ M en 1xPBS a 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 800 ms y 1.0 s. (256 incrementos de fides y 32 acumulaciones por incremento) a 298K.
- Complejo formado con el disacárido **12**, **13** y **15**. Las relaciones proteína-ligando utilizadas para medir curvas de crecimiento fueron para el disacárido **12** 1:200; para **13** 1:300 y para **15** de 1:300. Los experimentos se realizaron con 256 incrementos en t1 y 32 acumulaciones por incremento a 298K y 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0.

#### **4.5.5 Estudio de todos los complejos (disacáridos y tetrasacáridos) mediante docking.**

El último apartado de la parte experimental es la explicación del procedimiento del docking llevado a cabo para todos los complejos formados con la Midkina. Debido a que el procedimiento ha sido el mismo y los programas utilizados también ha sido lo mismos se ha va explicar como un único procedimiento el cual se puede aplicar en todos los casos.

##### **4.5.3.1 Preparación de estructuras.**

La estructura de la Midkina fue obtenida de la estructura del cristal con código 1MDK de la base de datos “protein bank”. Esta es importada mediante una herramienta de Maestro, PrepWiz. Los ligandos (tanto tetrasacárido como disacáridos) fueron construidos a partir de los residuos implementados en Macromodel de Schödinger. FALTA CITA

##### **4.5.3.2 Generación del Grid.**

Una vez que se obtuvieron las dos estructuras generó un Grid como previo a la realización del docking. Para asegurar un reconocimiento completo del ligando sobre el sitio activo de la proteína el Grid utilizado para todos los complejos fue bastante grande cuyo centro se situaba entre los dos dominios de la Midkina. Se generó un cubo de 30 Å

de lado desde el centro del ligando y un subgrid de 10 Å desde el centro geométrico del ligando fue definido.

#### 4.5.3.3 Docking flexible.

Para todos los complejos se llevó a cabo un docking flexible (SP, *del inglés Simple Precision*) con Glide a partir del ligando creado manteniendo la conformación del anillo y permitiendo la penalización de la conformación no planar para torsiones tipo amida y las inversiones de nitrógeno. De todas las poses obtenidas, sólo las 20 mejores obtenidas después de la aplicación de los filtros del propio docking (ver metodología capítulo 2) y utilizadas para el análisis. Después de ese docking se llevó a cabo un docking extra precisión (XP, *del inglés Extra Precision*) con las 10 estructuras obtenidas de menor energía para los productos que contenían grupos bencilos. Esto se decidió hacer debido precisamente a la presencia de esos grupos y a que los ligandos enlazan fuertemente a la proteína encontrando términos de penalización en este tipo de docking.

#### 4.5.6 Estudio de todos los compuestos (disacáridos y tetrasacáridos) mediante dinámica molecular.

Antes de la realización de la dinámica molecular se llevó a cabo la preparación de las entradas necesarias. Primero, se utilizó la estructura de los compuestos (tetrasacáridos y disacáridos) creada mediante Macromodel. La mayoría de los complejos presentaban grupos Bn y Bz no parametrizados en Glycam por lo que para el azúcar se usó Glycam-06j<sup>31</sup> pero para los demás residuos se necesitó un conjunto de parámetro obtenidos de los módulos Antechamber y Parmchk de Amber. Las cargas para los grupos creados fueron derivadas desde el potencial molecular electrostático (MEP, *del inglés Molecular Electrostatics Potential*) usando el método RESP<sup>32</sup> (del servidor web R.E.D<sup>33</sup>) y asumiendo una carga total para cada residuo de 0 y compensando siempre la carga de los átomos quitados y grupos añadidos en los átomos de Nitrógeno u Oxígeno donde se unen los grupos Bn o Bz. Para la unión de los grupos sulfato (parametrizados en

---

<sup>31</sup> K.N. Kirschner, A.B. Yongye, S.M. Tschampel, J. Gonzalez-Outeirino, C.R. Daniels, B.L. Foley, R.J. Woods, *Journal of Computational Chemistry* **2008**, 29, 622.

<sup>32</sup> C.I. Bayly, P. Cieplak, W.D. Cornell, P.A. Kolman, *Journal of Physical Chemistry* **1993**, 97, 10269.

<sup>33</sup> F.Y. Dupradeau, C. Cézard, R. Lelong, É. Stanislawiak, Pê, J. Cher, J.C. Delepine, P. Cieplak, *Nucleic Acids Research* **2008**, 36, D360.

Glycam) a los oxígenos de los anillos del carbohidrato también se necesitó una compensación de carga en los átomos de oxígenos a los que van unidos. Este protocolo de compensación de cargas ha sido anteriormente utilizado en el grupo de investigación donde se ha realizado esta tesis doctoral a partir de un protocolo similar que fue desarrollado para la parametrización de compuestos derivados de diferentes azúcares.<sup>34,35</sup> Por último, la topología y coordenadas del compuesto entero se construyeron mediante el módulo tLEAP de AMBER 12.<sup>36</sup> El sistema se neutralizó con iones sodio y solvató incluyéndolo en una caja de agua TIP3P<sup>37</sup> y tanto para las moléculas de agua como para los iones se usaron los parámetros ff12SB de Amber.<sup>38</sup>

La producción de la dinámica sin restricciones para todos los complejos fue de 500 ns mediante el módulo de pmemd.MPI de Amber 12<sup>36</sup> (ver procedimiento de la dinámica molecular en el capítulo de metodología 2.4.2). Las dinámicas con restricciones promediadas en el tiempo, utilizando siempre distancias de referencia entre los átomos, se llevaron a cabo de 8 ns. Estas distancias impuestas dependen del anillo de azúcar a tratar, por ejemplo, para el IdoA se utilizó la restricción H2/H5 mientras que para los demás anillos GalNAc, GlcA, Glc o GlcNAc se utilizó las restricciones entre los hidrógenos H1, H3 y H5 dependiendo de los datos experimentales.

Para el análisis de la producción de las dinámicas se utilizó el módulo cpptraj de Amber obteniendo así distancias y ángulos diedros. Para el cálculo de las  $^3J_{HH}$  se utilizaron unos script con la ecuación de Altona teniendo en cuenta las diferentes electronegatividades de los grupos agregados (bencilos y benzoilos) y las coordenadas de Cremer-Pople se obtuvieron mediante unos script utilizados en el grupo anteriormente.

<sup>34</sup> S.G. Gouin, E. Vanquelerf, J.M.G. Fernández, C.O. Mellet, F.Y. Dupradeau, J. Kovensky, *Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72, 9032.

<sup>35</sup> N. Sapay, E. Cabannes, M. Petiou, A. Imberty, *Glycobiology* **2011**, 21, 1181.

<sup>36</sup> T. A. D. D. A Case, T. E. Cheatham, III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R., R. C. W. Luo, W. Zhang, X. Wu, S. R. Brozell, H. G. T. Steinbrecher, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M. J. Hesieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H., M. G. S. Mathews, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P. A. Kollman, *University of California, San Francisco* **2010**.

<sup>37</sup> W.I. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey and M.L. Klein, *The Journal of Chemical Physics* **1983**, 79, 926.

<sup>38</sup> T.A.D.D.A Case, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R., R.C.W. Luo, W. Zhang, X. Wu, S.R. Brozell, H.G.T. Steinbrecher, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.J. Hesieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H., M.G.S. Mathews, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P.A. Kollman, *University of California, San Francisco* **2012**.

## **CAPÍTULO 5**

### **Interacción de Pleiotrofina con GAGs**

## 5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

En este último capítulo se van a discutir los resultados más relevantes obtenidos del estudio de la interacción de diferentes GAGs con la Pleiotrofina. Esta proteína es un factor de crecimiento la cual junto con la Midkina constituyen una familia de factores de crecimiento neuronales.

Como se mencionó en el capítulo 1 donde se explican las estructuras y funciones de las diferentes proteínas de esta tesis doctoral, la Pleiotrofina es una potente citoquina mitogénica. Esta proteína está presente en una gran cantidad de funciones producidas en la superficie celular.<sup>1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16</sup> Además, esta proteína participa en el desarrollo del sistema nervioso central y en la reparación y regeneración de tejidos<sup>17,18,19</sup>.

---

<sup>1</sup> M. Hatzia Apostolou, J. Delbe, P. Katsoris, C. Polytarchou, J. Courty, E. Papadimitriou, *Prostate* **2005**, *65*, 151.

<sup>2</sup> R. Jager, K. Nöll, K. Havemann, KH. Pfluger, C. Knabbe, H. Rauvala, G. Zugmaier, *International Journal of Cancer* **1997**, *73*, 537.

<sup>3</sup> R. Mentlein, J. Held-Feindt, *Journal of Neurochemistry* **2002**, *83*, 747.

<sup>4</sup> F. Vacherot, D. Caruelle, D. Chopin, S. Gil-Diez, D. Barritault, J.P. Caruelle, J. Courty, *Prostate* **1999**, *38*, 126.

<sup>5</sup> A. Wellstein, W.J. Fang, A. Khatri, Y. Lu, S.S. Swain, R.B. Dickson, J. Sasse, A.T. Riegel, M.E. Lippman, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 2582.

<sup>6</sup> L. Zhang, T. Mabuchi, E. Satoh, S. Maeda, H. Nukui, H. Naganuma, *Neurologia Medico Chirurgica (Tokyo)* **2004**, *44*, 637.

<sup>7</sup> N. Zhang, R. Zhong, Z.Y. Wang, T.F. Deuel, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 16733.

<sup>8</sup> D. Weber, H.J. Klomp, F. Czubyko, A. Wellstein, H. Juhl, *Cancer Research* **2000**, *60*, 5284.

<sup>9</sup> Y. Kong, P.S. Bai, K. J. Nan, H. Sun, N.Z. Chen, X.G. Qi, *International Journal of Colorectal Disease* **2012**, *27*, 287.

<sup>10</sup> E. Gramage, G. Herradon, Y.B. Martin, M. Vicente-Rodriguez, L. Rojo, H. Gnekow, A. Barbero, C. Perez-Garcia, *Toxicology* **2013**, *306*, 2147.

<sup>11</sup> G. Herradon, C. Perez-Garcia, *British Journal of Pharmacology*, **2014**, *171*, 837.

<sup>12</sup> M. Vicente-Rodriguez, E. Gramage, G. Herradon, C. Perez-Garcia, *Toxicology* **2013**, *314*, 166.

<sup>13</sup> E. Gramage, G. Herradon, *Current Pharmaceutical Design* **2011**, *17*, 449.

<sup>14</sup> G. Herradon, L. Ezquerro, *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16*, 3322.

<sup>15</sup> D.M. Marchionini, E. Lehrmann, Y. Chu, B. He, C.E. Sortwell, K.G. Becker, W.J. Freed, J.H. Kordower, *Brain Research* **2007**, *1147*, 77.

La estructura de la Pleiotrofina no se encuentra tan definida como la estructura de la Midkina a pesar de que ambas presentan un 45% de similitud. Para la Midkina es bien conocido los 4 clusters y la zona hinge donde se produce la interacción con los GAGs derivados de CS. Sin embargo, la distribución de los aminoácidos básicos en el NTD (dominio N terminal) de la Pleiotrofina es diferente a la Midkina. Dicha proteína presenta un clúster de aminoácidos básicos en el extremo NTD similar a la Midkina del pez “zebra” pero con un aminoácido adicional, R39<sup>20,21</sup>.

Se han llevado a cabo diferentes estudios de interacción de GAGs (Hp<sup>22, 23</sup> y CS<sup>24,25,26,27</sup>) con la Pleiotrofina. Uno de los últimos resultados pone de manifiesto que la zona hinge de la PTN presenta un papel importante en la interacción con GAGs tipo CS, además del segmento C-terminal de la PTN. También es conocido que la PTN presenta gran diversidad en las afinidades por los diferentes tipos de CS. Así se sabe que el CS-C presenta una afinidad más alta que el CS-A y por supuesto, que el CS-E sirve como receptores altamente afines a la PTN<sup>28</sup>.

---

<sup>16</sup> I.R. Taravini, M. Chertoff, E.G. Cafferata, J. Courty, M.G. Murer, F.J. Pitossi, O.S. Gershanik, *Molecular Neurodegeneration* **2011**, 6, 40.

<sup>17</sup> H.J. Yeh, Y.Y. He, J. Xu, C.Y. Hsu, T.F. Deuel, *Journal of Neuroscience* **1998**, 18, 3699.

<sup>18</sup> Y.S. Li, P.G. Milner, A.K. Chauhan, M.A. Watson, R.M. Hoffman, C.M. Kodner, J. Milbrandt, T.F. Deuel, *Science* **1990**, 250, 1690.

<sup>19</sup> H.A. Himburg, J.R. Harris, T. Ito, P. Daher, J.L. Russell, M. Quarmyne, P.L. Doan, K. Helms, M. Nakamura, E. Fixsen, G. Herradon, T. Reya, N.J. Chao, S. Harroch, J. P. Chute, *Cell Reports* **2012**, 2, 964.

<sup>20</sup> W. Iwasaki, K. Nagata, H. Hatanaka, T. Inui, T. Kimura, T. Muramatsu, K. Yoshida, M. Tasumi, F. Inagaki, *The EMBO Journal* **1997**, 16, 6936.

<sup>21</sup> J. Lim, S. Yao, M. Graf, C. Winkler, D. Yang, *Biochemical Journal* **2013**, 451, 407.

<sup>22</sup> E. Raulo, S. Tumova, I. Pavlov, M. Pekkanen, A. Hienola, E. Klankki, N. Kalkkinen, T. Taira, I. Kilpelainen, H. Rauvala, *Journal Biological Chemistry* **2005**, 280, 41576.

<sup>23</sup> A. Ori, P. Free, J. Courty, M.C. Wilkinson, D.G. Fernig, *Molecular and Cellular Proteomics* **2009**, 8, 2256.

<sup>24</sup> N. Maeda, N. Fukazawa, T. Hata, *The Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, 4894.

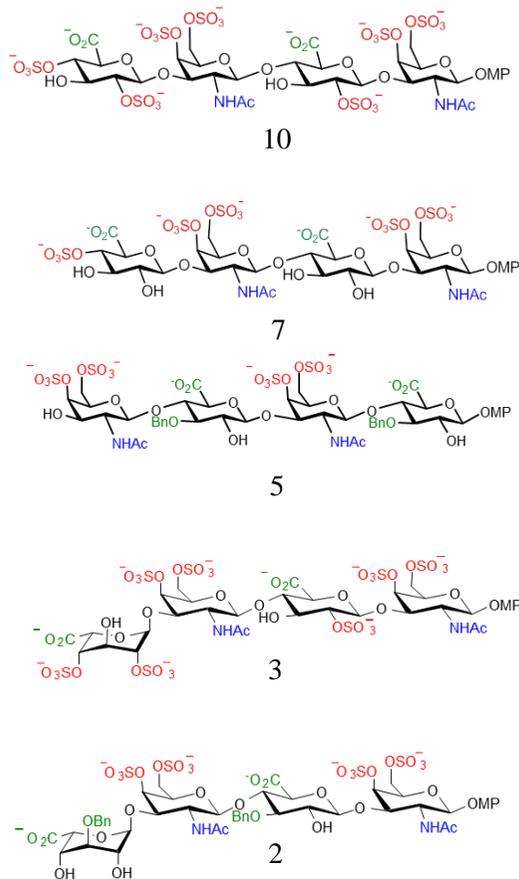
<sup>25</sup> S. Mizumoto, D. Fongmoon, K. Sugahara, *Glycoconjugate Journal* **2013**, 30, 619.

<sup>26</sup> F. Li, C.D. Nandini, T. Hattori, X. Bao, D. Murayama, T. Nakamura, N. Fukushima, K. Sugahara K, *The Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 27673.

<sup>27</sup> S. Mizumoto, S. Murakoshi, K. Kalayanamitra, S.S. Deepa, S. Fukui, P. Kongtawelert, S. Yamada, K. Sugahara K, *Glycobiology* **2003**, 23, 155.

<sup>28</sup> E. Ryan, D. Shen, X. Wang, *The FEBS Journal* **2016**, 283, 1488.

En este último capítulo de la presente tesis doctoral se ha querido determinar la interacción de la PTN con diferentes tipos de GAGs-CS (tipo E y T) e híbridos DS/CS y comprobar si existe una influencia del número de grupos aromáticos y la afinidad por PTN. De la librería de tetrasacáridos sintéticos cuya estructura tridimensional fue analizada en el capítulo 4, se eligieron aquellos que podían proporcionar alguna información de la influencia de la secuencia, bencilación y sulfatación en la interacción con PTN. Los tetrasacáridos cuyos resultados se van a estudiar en este capítulo son el **2**, **3**, **5**, **7**, **8** y **10** (figura 5.1).



Para la realización de los experimentos de RMN en condiciones de equilibrio rápido y poder aplicar los mismos experimentos que los empleados en esta tesis con el fin de establecer relaciones cuantitativas, todas las muestras a estudiar se prepararon con las mismas condiciones, con la misma concentración de proteína-ligando y el mismo buffer: se preparó una muestra con 20  $\mu\text{M}$  de Pleiotrofina y 1 mM de ligando en 250  $\mu\text{L}$  de buffer 1xPBS para todos los tetrasacáridos.

Este estudio de esta interacción proteína-ligando se ha llevado a cabo mediante técnicas de Espectroscopía de RMN<sup>29,30,31</sup>. Las técnicas utilizadas de interacción mediante la observación del ligando han sido NOESY transferido y STD.<sup>32,33</sup>

## OBJETIVOS.

- Estudio de la interacción de la Pleiotrofina con los diferentes tetrasacáridos mediante técnicas de RMN. Determinación de la estructura tridimensional del ligando enlazado (mediante experimentos tr-NOESY) y de la orientación del ligando cuando interacciona con la proteína (mediante experimentos STD). Comparación de dicha estructura cuando se encuentra enlazado a la Midkina y Pleiotrofina.
- Determinar la posible influencia de la sulfatación, la secuencia y la *O*-sustitución en la estructura del ligando al enlazar a la PTN.
- Evaluar la existencia de los efectos encontrados en la PTN referidos al aumento de la afinidad al incrementar los *O*-sustituyentes (bencilos y benzoilos).

## 5.2 DISCUSIÓN Y RESULTADOS.

Este apartado está dividido en dos partes, por un lado, el estudio de la interacción de los complejos formados por los tetrasacáridos no protegidos (**3**, **7** y **10**) y, por otro, el estudio de la interacción de los complejos formados por los dibencilados (**2**, **5** y **8**), ambos con la PTN.

### 5.2.1 INTERACCIÓN DE LOS TETRASACÁRIDOS NO PROTEGIDOS CON LA PLEIOTROFINA (3, 7 Y 10).

#### ➤ Complejo formado con el tetrasacárido 3.

---

<sup>29</sup> L. Fielding, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2007**, 51, 219.

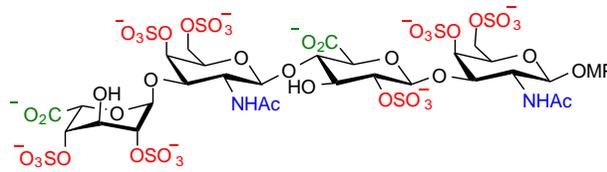
<sup>30</sup> C. A. Lepre, J. M.f Moore, J. W. Peng, *Chemical Reviews* **2004**, 104, 3641.

<sup>31</sup> J. W. Peng, J. Moore, N. Abdul-Manan, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2004**, 44, 225.

<sup>32</sup> M. Mayer, B. Meyer, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 6108.

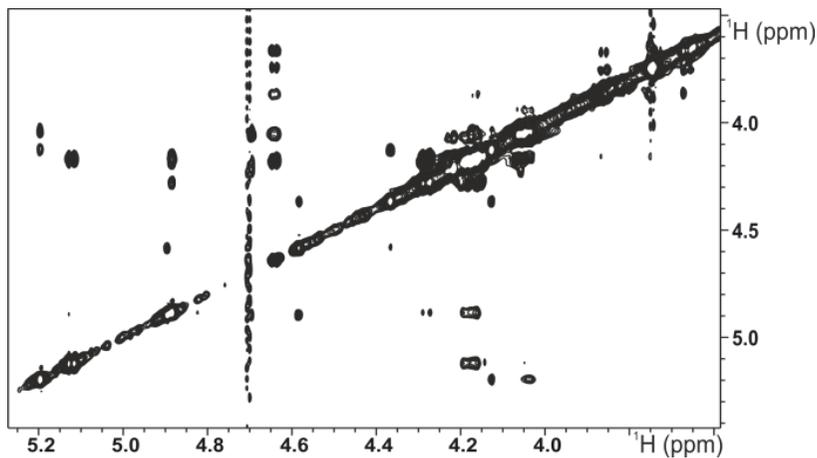
<sup>33</sup> J. Angulo, P.M. Nieto, *European Biophysics Journal* **2011**, 40, 1357.

El tetrasacárido **3** (**figura 5.2.1.1**) es un híbrido DS/CS el cual posee tres anillos con características diferentes (GlcA, IdoA y GalNAc).



**Figura 5.2.1.1** Estructura del tetrasacárido **3** con secuencia DS/CS (tipo E) más un grupo sulfato en posición 4 del anillo de IdoA en el extremo no reductor.

El primer experimento realizado para el complejo formado entre el tetrasacárido **3** y la PTN fue un NOESY transferido a 200 ms para determinar si la conformación del ligando en su estado enlazado, al igual que con la Midkina, se modificaba o no, apreciablemente. La **figura 5.2.1.2** representa el espectro 2D-NOESY para tal complejo.

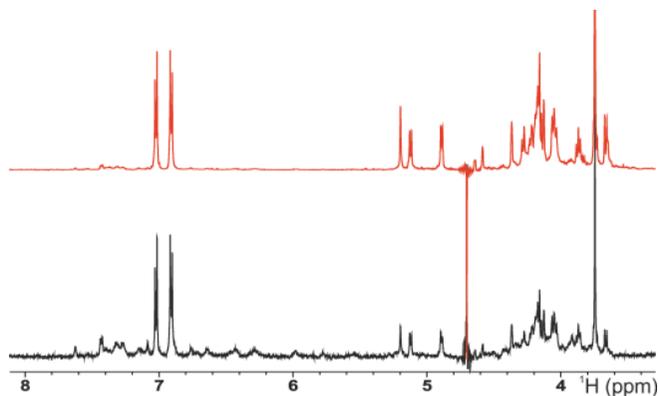


**Figura 5.2.1.2** Espectro bidimensional NOESY transferido obtenido a 200 ms y a 298K para el complejo formado con el tetrasacárido **3**. Se llevó a cabo con 432 incrementos de fid, 4k de puntos complejos y 16 acumulaciones por incremento.

Según el análisis *cualitativo* de los NOEs obtenidos (**Figura 5.2.1.2**) se deduce que dicho tetrasacárido presenta la misma conformación  ${}^4C_1$  mayoritaria para los anillos A, B y C y otra conformación mayoritaria para el anillo D,  ${}^1C_4$ , de acuerdo con lo descrito para el iduronato en el terminal no reductor. En este caso no se observa ningún pico de

NOE exclusivo de la conformación  ${}^2S_0$ , otra posibilidad frecuente, mientras que sí se observan los NOEs secuenciales H1D/H2D, H2D/H3D, H3D/H4D/ y H4D/H5D típicos de una disposición ecuatorial de los hidrógenos anulares excepto el H5D que se encuentra en disposición axial. Además, las  ${}^3J_{HH}$  obtenidas para este anillo son todas pequeñas correspondientes con una conformación  ${}^1C_4$  mayoritaria o exclusiva. La estabilidad conformacional que presenta este anillo es producida por los grupos sulfato presentes en las posiciones 2 y 4 de dicho anillo, que por repulsión electrostática tienden a estar lo más alejados posible entre sí. Esto indica que la conformación del ligando enlazado bien a la PTN o a la MDK es igual que en su estado libre.<sup>34</sup>

El siguiente experimento que se realizó para determinar la orientación del ligando en el complejo fue el  ${}^1H$ -STD a 298K. Se registraron series de experimentos a diferentes tiempos de irradiación de la proteína (0.5, 1, 2, 3 y 4 s) para obtener la curva de crecimiento del STD y, a partir de esta, calcular los valores de  $STD_0$ . La **figura 5.2.1.3** muestra los espectros monodimensionales obtenidos de dicho experimento a 4 s de saturación correspondiente al tetrasacárido **3**. El espectro rojo es el espectro  ${}^1H$ -RMN y el negro el  ${}^1H$ -STD (intensidad de las señales ampliada con respecto al  ${}^1H$ -RMN). Este último espectro indica que se produce una gran interacción entre el tetrasacárido y la PTN y que la cinética del equilibrio es favorable para la observación de señales de transferencia de magnetización en el espectro de STD.



**Figura 5.2.1.3** Espectro  ${}^1H$ -RMN (rojo) y espectro  ${}^1H$ -STD (negro) a 4 s de saturación obtenidos a 298K y a 1024 escanes.

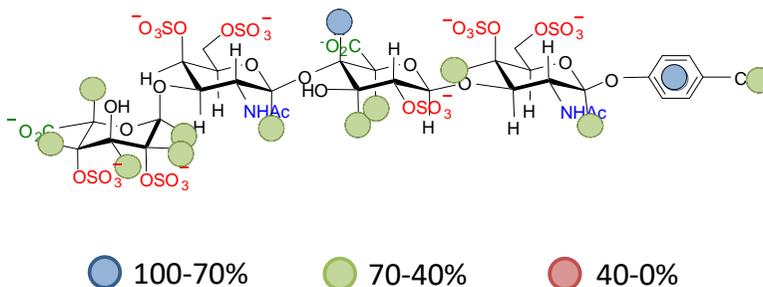
Los valores de  $STD_0$  calculados a partir de la curva de crecimiento de STD se muestran en la **tabla 5.2.1.1** la cual recoge los valores de  $STD_0$  absolutos y relativos para el tetrasacárido **3**. Aunque son pocos los valores que se han podido medir debido al solapamiento que generan las señales de los sustituyentes y la agrupación de señales entorno a 4 ppm, sin embargo, el 100% de saturación corresponde a un 3.5% lo que

indica una interacción relativamente buena para usarse en el empleo del mapa del epítipo de la interacción.

Nombre	STD <sub>0</sub> rel./abs.	Nombre	STD <sub>0</sub> rel./abs.
H1A	46/1.6	H1C	34/1.2
H2A	3.1/89	H1D	35/1.2
H3B	65/2.3	H2D	58/2.0
H4B	<b>100/3.5</b>	H3D	54/1.9
H5B	41/1.4	H4D	47/1.6
Ph-OMP	77/2.7	H5D	43/1.5
		CH <sub>3</sub> -OMP	41/1.4

**Tabla 5.2.1.1** Tabla representativa de los valores de STD<sub>0</sub> relativos y absolutos para los cuatro anillos (A, B, C y D) medidos a partir de la curva de crecimiento del STD a 0.5, 1, 2, 3 y 4 s de saturación a 298K para el tetrasacárido **3**.

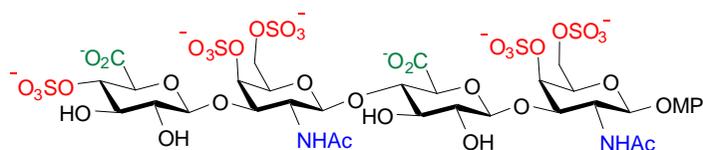
El mapa del epítipo para dicho tetrasacárido (**figura 5.2.1.4**) indica un modo de unión indefinido para el tetrasacárido a la proteína. Todos los protones reciben saturación en un rango de entre 30 y 70% lo cual indica un modo de unión lineal en el cual el ligando se encuentra rodeado de la proteína. Estos resultados sugieren que la orientación del tetrasacárido en el complejo es similar a la de la Midkina.



**Figura 5.2.1.4** Mapa del epítipo del tetrasacárido **3** medido de los experimentos de STD a diferentes tiempos de saturación 0.5, 1, 2, 3 y 4 s a 298K.

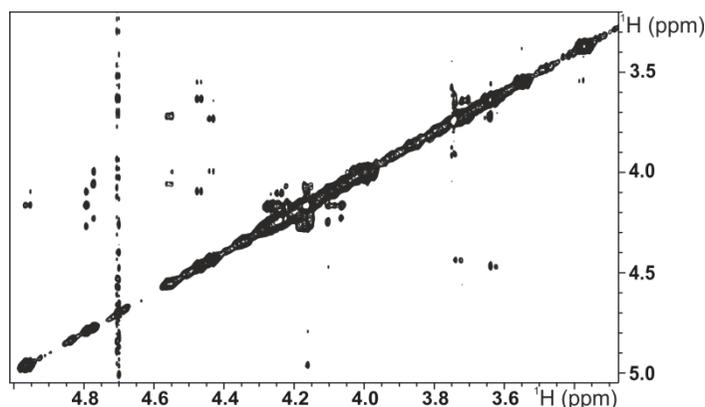
➤ **Complejo formado con el tetrasacárido 7.**

El tetrasacárido **7** presenta una secuencia de CS tipo E, es decir, muestra grupos sulfato en las posiciones 4 y 6 de los anillos de GalNAc y debido a métodos sintéticos se incluyó uno adicional en la posición 4 del anillo de GlcA del extremo no reductor en todos los tetrasacáridos de la serie C (**figura 5.2.1.5**).



**Figura 5.2.1.5** Secuencia CS tipo E más un grupo sulfato en posición 4 del extremo no reductor que representa al tetrasacárido **7**.

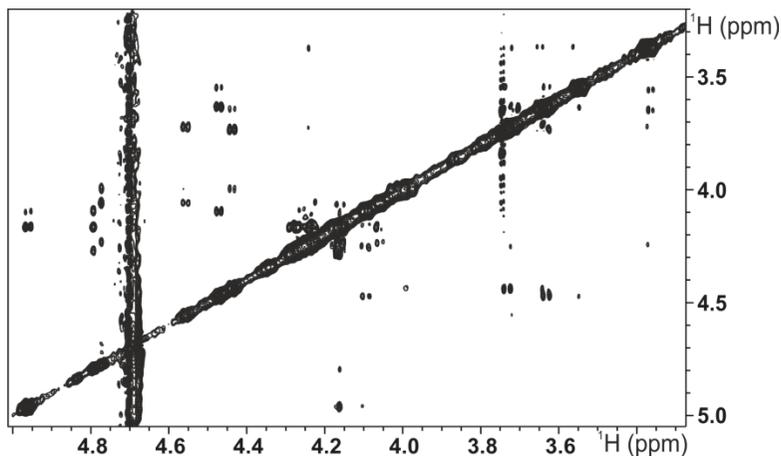
El primer experimento llevado a cabo sobre el complejo fue un NOESY transferido con un tiempo de mezcla de 200 ms para definir la estructura del ligando enlazado. Se observan los NOEs (H1X/H3X y H1X/H5X) representativos para la conformación  ${}^4C_1$  para todos los anillos y los NOEs interglicosídicos compatibles con una estructura extendida tipo syn- $\Psi$  (**figura 5.2.1.6**). Esta estructura del ligando dentro del complejo es la misma que cuando se encuentra de forma libre complejo con la Midkina.



**Figura 5.2.1.6** Espectro bidimensional NOESY transferido obtenido a 200 ms y a 298K para el complejo formado con el tetrasacárido **7**. Se realizó con 512 incrementos de fides, 4k de puntos complejos y 16 acumulaciones por incremento.

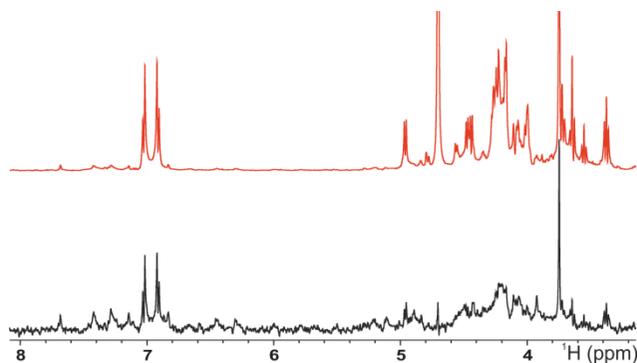
Debido a la poca intensidad de los picos NOEs obtenidos se decidió llevar a cabo un experimento tr-ROESY el cual tiene otra dependencia diferente del tiempo de correlación,  $\tau_c$ . El espectro obtenido se muestra en la **figura 5.2.1.7**. Este ha sido el

único compuesto que se analizó mediante este experimento ya que es el que presenta una masa molecular más pequeña, y por tanto, un tiempo de correlación menor al estar menos sulfatado que los otros dos tetrasacáridos no protegidos estudiados con la PTN. Con este experimento se confirma la conformación extendida para el tetrasacárido ya que se obtienen los NOEs correspondientes a una disposición *syn-Ψ* del enlace glicosídico.



**Figura 5.2.1.7** Espectro obtenido del experimento tr-ROESY a 200 ms y 298K para el tetrasacárido **7**. Se realizó con 512 incrementos de fid, 4k de puntos complejos y 16 acumulaciones por incremento.

El siguiente experimento que se realizó fue el  $^1\text{H}$ -STD a 298K para determinar la orientación del ligando en el complejo. Los tiempos de irradiación en este caso fueron 0.5, 1, 2, 3 y 4 s para obtener la curva de crecimiento del STD y, por consiguiente, los valores de  $\text{STD}_0$ . La **figura 5.2.1.8** muestra los dos espectros monodimensionales obtenidos para el tetrasacárido **7** a 4 s de saturación. El espectro  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) y el  $^1\text{H}$ -STD (negro) muestran la interacción que se produce en este tetrasacárido y la PTN. En este caso se observa un espectro de STD con señales más anchas indicando una gran interacción entre la proteína y el ligando.

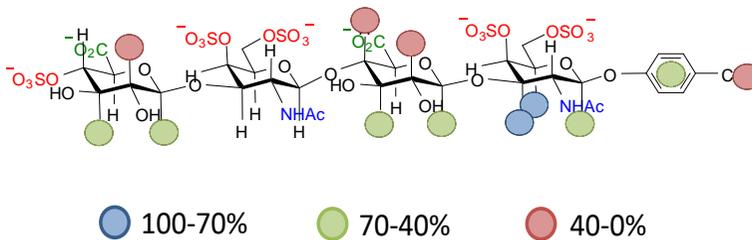


**Figura 5.2.1.8** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) y espectro  $^1\text{H}$ -STD (negro) a 4 s de saturación obtenidos a 298K y a 1024 escanes para el tetrasacárido **7**.

Por último, los valores de  $\text{STD}_0$  absolutos y relativos para el tetrasacárido **7** se representan en la **tabla 5.2.1.2**. En este caso, los valores de  $\text{STD}_0$  absolutos son bajos pero mayores que para el tetrasacárido anterior (100% equivale a 5.1%) esto sugiere en principio una mayor interacción, de forma general. El mapa del epítipo (**figura 5.2.1.9**) muestra un rango amplio de valores de STD relativos desde un 22 a un 100%. Parece que los protones que se han podido medir en un lado del eje longitudinal de la proteína presentan una saturación más baja comprendida entre un 0 y 30% que los protones del otro lado del eje. Desafortunadamente, no se pudo medir ningún protón para el anillo C. Si se asumiese que este anillo presenta la misma tendencia que para los demás anillos quizás se podría identificar un modo de unión diferente a los demás tetrasacáridos. Sin embargo, falta la saturación recibida por ese anillo y por más hidrógenos de la cara opuesta, lo cual imposibilita definir un modo de unión diferente. Otra diferencia significativa es la diferencia de saturación recibida por el mismo anillo aromático del OMP, que no recibe tanta saturación como **3** encontrándose un rango de saturación intermedio. Todo esto puede reflejar un modo de unión diferente aunque no se llegue a conocer que grado de diferencia presenta.

Nombre	$\text{STD}_0$ rel./abs.	Nombre	$\text{STD}_0$ rel./abs.
H1A	35/1.8	H1D	61/3.1
H3A	97/4.9	H2D	22/1.1*
H5A	<b>100/5.1</b>	H3D	31/1.6
H1B	43/2.2	$\text{CH}_3$ -OMP	26/1.3
H2B	22/1.1*	Ph-OMP	62/3.2
H3B	30/1.5		

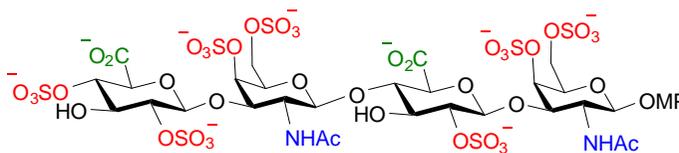
**Tabla 5.2.1.2** Tabla representativa de los valores de  $STD_0$  relativos y absolutos para los cuatro anillos (A, B, C y D) medidos a partir de la curva de crecimiento del STD a 0.5, 1, 2, 3 y 4 s de saturación a 298K para el tetrasacárido 7.



**Figura 5.2.1.9** Mapa del epítipo del tetrasacárido 7 medido de los experimentos de STD a diferentes tiempos de saturación 0.5, 1, 2, 3 y 4 s a 298K..

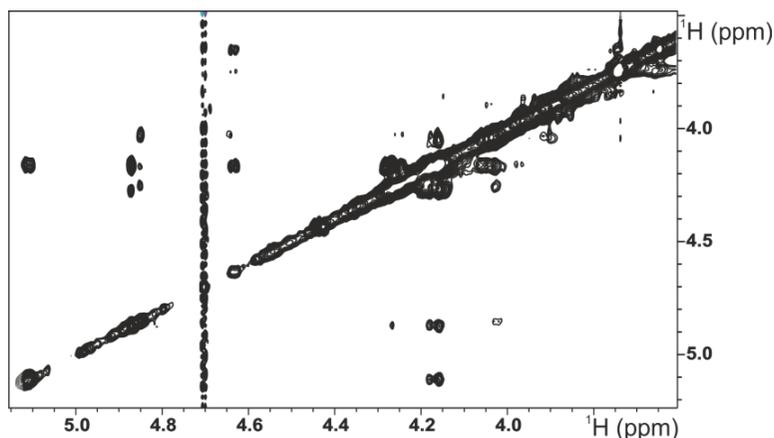
➤ **Complejo formado por el tetrasacárido 10.**

Este tetrasacárido presenta una secuencia de CS igual que el anterior pero en este caso el patrón de sulfatación es de tipo T en vez de tipo E, incluyendo un sulfato adicional en los anillos de glucuronato y como para el tetrasacárido anterior presenta un grupo sulfato en el anillo del extremo no reductor (**figura 5.2.1.10**).



**Figura 5.2.1.10** Secuencia CS tipo T más un grupo sulfato en posición 4 del extremo no reductor que representa al tetrasacárido 10.

Este tetrasacárido en el complejo muestra una conformación  ${}^4C_1$  para todos los anillos al igual que presentaba el ligando libre<sup>34</sup> (**figura 5.2.1.11**), evidente del análisis de las constantes de acoplamiento. Además, se observa una geometría syn- $\Psi$  para todos los enlaces interglucosídicos debido a la formación de los NOEs exclusivos de una conformación extendida. Por lo tanto, no se produce ningún cambio en dicha estructura al unirse con la PTN. El comportamiento de este tetrasacárido es similar a los otros dos no protegidos estudiados anteriormente indicando la gran estabilidad de estos ligandos al formar cualquier tipo de complejo, bien con la MDK o con la PTN.

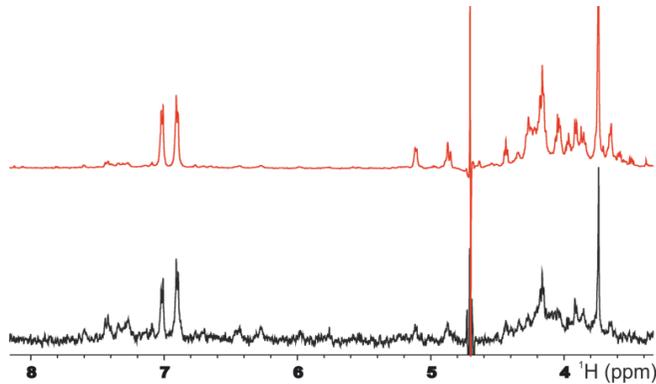


**Figura 5.2.1.11** Espectro obtenido del experimento NOESY transferido a 200 ms y 298K para el complejo formado con el tetrasacárido **10**. El experimento se llevó a cabo con 512 incrementos de la fid y 4k de puntos complejos y 16 acumulaciones por incremento.

Siguiendo el mismo protocolo que para los dos complejos estudiados se continuó con la realización de los experimentos de STD a diferentes tiempos de saturación (0.5, 1, 2, 3 y 4 s). Se obtuvieron los valores de  $STD_0$  absolutos a partir de las curvas de crecimiento y los  $STD_0$  relativos a partir de estos, ambos se recogen en la **tabla 5.2.1.3**. El espectro rojo representa el espectro  ${}^1H$ -RMN y el negro el  ${}^1H$ -STD (**figura 5.2.1.12**). En este caso, de nuevo aparecen valores de  $STD_0$  bajos, en contradicción con la afinidad esperada, que se ha confirmado posteriormente al calcular la constante de afinidad (ver más adelante). La baja intensidad de los espectros de transferencia de saturación se justifica por una cinética desfavorable siendo coherente para una interacción bastante

<sup>34</sup> C. Solera, G. Macchione, S. Maza, M.M. Kayser, F. Corzana, J.L. d Paz, P.M. Nieto, *Chemical European Journal* **2016**, *22*, 2356.

fuerte y prolongada entre proteína y ligando y, por consiguiente, se produce un ensanchamiento de las señales comparados con el compuesto libre.



**Figura 5.2.1.12** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) y espectro  $^1\text{H}$ -STD (negro) a 4 s de saturación obtenidos a 298K y a 1024 escanes para el tetrasacárido **10**.

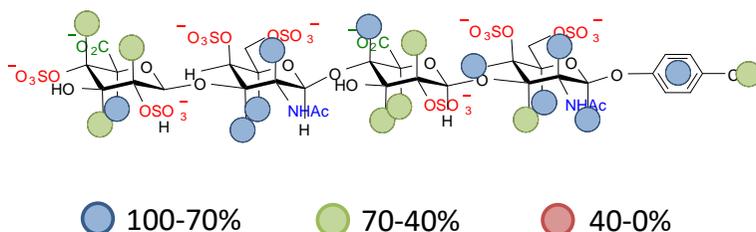
Para el tetrasacárido **10** se han podido medir más valores de  $\text{STD}_0$  absolutos y relativos (**tabla 5.2.1.3**) y estos valores son mucho más altos que en los dos casos anteriores (100% corresponde a 7.8%) indicando posiblemente una mayor interacción. Esto puede ser debido a la mayor presencia de grupos sulfato que para el tetrasacárido **7** lo que provoca una mayor estabilidad del complejo al establecer más interacciones electrostáticas con los grupos cargados positivamente de la proteína. Si se comparan estos datos con los obtenidos del complejo formado con el tetrasacárido **3** ya que los dos están persulfatados se puede deducir que en este caso se produce un aumento en la interacción debido al cambio de secuencia. Esta diferencia de los valores de  $\text{STD}$  (**tabla 5.2.1.3**) para la misma relación proteína-ligando no se observaron en los complejos formados por los mismos tetrasacáridos y la Midkina recogidos en el capítulo anterior.

Nombre	$\text{STD}_0$ relativo/absoluto	Nombre	$\text{STD}_0$ relativo/absoluto
H1A	83/6.4	H2C	<b>100/7.8</b>
H2A	87/6.8	H3C	77/6.0
H3A	58/4.6	H5C	89/7.0
H4A	91/7.1	H2D	60/4.7*
H5A	71/5.5	H3D	67/5.2
H2B	60/4.7*	H4D	69/5.4
H3B	38/3.0	H5D	85/6.6

H4B	78/6.1	CH3-OMP	3.2/3.3
H5B	60/4.7		
Ph-OMP	83/6.5		

**Tabla 5.2.1.3** Valores de  $STD_0$  absolutos y relativos para el tetrasacárido **10** a diferentes tiempos de saturación.

El mapa del epítipo para el tetrasacárido **10** está representado en la **figura 5.2.1.13**, este no indica un modo de unión privilegiado para el tetrasacárido a la proteína ya que prácticamente a todos los protones le llega saturación en un rango de entre 30 y 100%, es decir, le llega la saturación de forma muy dispersa no indicando ningún modo de unión diferente a que el ligando se oriente de forma lineal y sea rodeado por la proteína, recibiendo magnetización por todas sus caras.



**Figura 5.2.1.13** Mapa del epítipo del tetrasacárido **10** medido de los experimentos de STD a diferentes tiempos de saturación 0.5, 1, 2, 3 y 4 s a 298K..

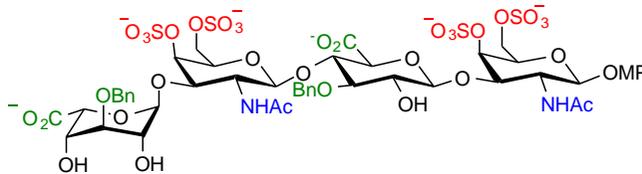
Si analizamos los datos obtenidos para los 3 complejos no protegidos parece indicar que en este caso sí influye la secuencia del oligosacárido en la interacción ya que aumenta los valores de STD y en los espectros de STD se pueden observar señales más definidas en uno que en las demás. A pesar de esto, no se puede definir un único modo de unión ni un modo diferente para alguno de ellos.

## 5.2.2 INTERACCIÓN DE LA PLEIOTROFINA CON TETRASACÁRIDOS DIBENCILADOS (2, 5 Y 8).

El procedimiento utilizado para la determinación de la estructura del complejo formado con los tetrasacáridos dibencilados y la PTN por RMN fue el mismo que para los tetrasacáridos desprotegidos (experimentos de NOESY transferido y STD).

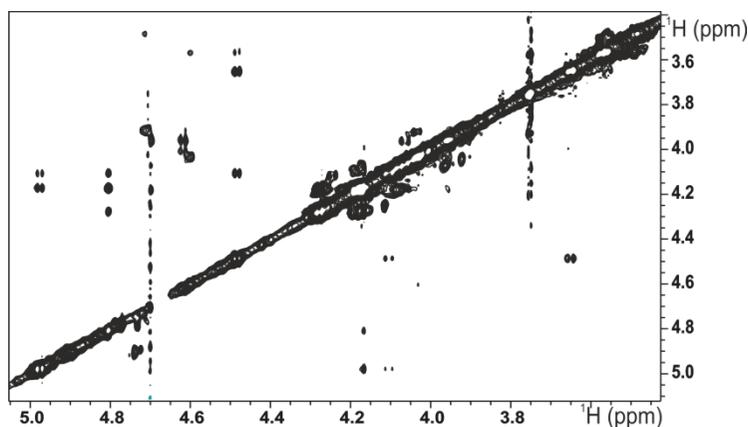
## ➤ Tetrasacárido 2.

El tetrasacárido **2** presenta una estructura híbrida DS/CS exhibiendo un residuo IdoA en su extremo no reductor (**figura 5.2.2.1**). El patrón de sulfatación es de tipo E y contiene dos grupos bencilo en las posiciones 3 de los dos anillos de ácido urónico.



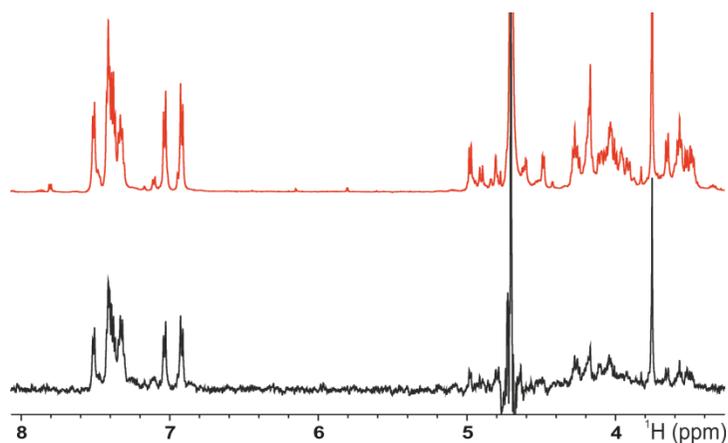
**Figura 5.2.2.1** Estructura del tetrasacárido **2** que presenta una secuencia híbrida DS/CS con dos grupos bencilos en los anillos de IdoA y GlcA.

Siguiendo la tendencia de todos los tetrasacáridos en presencia de pleiotrofina se comportan en disolución como cuando está en su forma libre. El anillo de IdoA muestra una conformación mayoritaria  ${}^2S_0$  del residuo de iduronato (caracterizada por un pico de cruce NOE H2D/H5D en el espectro 2D-NOESY) sin evidencia alguna de otra conformación aunque podría estar presente de forma minoritaria (**figura 5.2.2.2**). Para tener constancia de la existencia de otra conformación se debería de llevar a cabo un estudio *cuantitativo* empleando modelización molecular para obtener datos de constantes de acoplamiento y distancias experimentales a lo largo de la trayectoria y así determinar las poblaciones conformacionales del sistema. Además, se debería de repetir el mismo experimento de NOESY transferido a diferentes tiempos de mezcla para obtener la curva de crecimiento del NOE y el valor de  $\sigma^{\text{NOE}}$ . Al igual que la conformación de este tetrasacárido no cambiaba al formarse el complejo con la MDK, en principio, parece que tampoco se modifica su estructura al interactuar con la PTN.



**Figura 5.2.2.2** Espectro bidimensional NOESY transferido del tetrasacárido **2** a 298K realizado con 512 incrementos de fid y 15 acumulaciones.

Uno de los experimentos de STD llevados a cabo para el tetrasacárido **2** se muestra en la **figura 5.2.2.3**. El espectro de STD (negro) y el  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) realizados con un tiempo de saturación de 4 s predicen que se produce interacción entre dicho tetrasacárido y la PTN al observar señales de transferencia de saturación ente la PTN y el carbohidrato. En general, se observa una transferencia de saturación extremadamente dispersa con todos los protones del carbohidrato recibiendo saturación desde la proteína en mayor o menor medida.



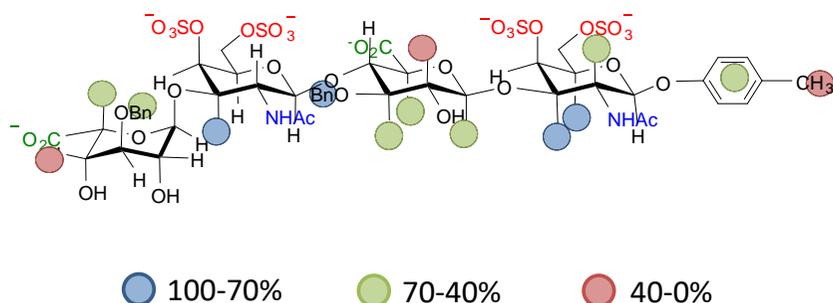
**Figura 5.2.2.3** Espectro de referencia (rojo) y de STD (negro) a 4 s de saturación, 298K y 600 MHz para el tetrasacárido **2**.

Para obtener más información de estos experimentos se midieron los valores de  $STD_0$  (tabla 5.2.2.1) por ajuste de los valores de STD obtenidos a diferentes tiempos de saturación. Dichos valores, para el tetrasacárido **2**, son fiables pero escasos y muy bajos ya que el 100% corresponde a un valor de 1.8%. Esto puede ser debido tanto a una interacción alta con la correspondiente cinética lenta entre el receptor y el ligando como a una interacción más débil. El espectro de STD de la figura 5.2.2.3 apunta a la primera posibilidad. Esta fue confirmada por las constantes de afinidad que se midieron para este complejo y que se discutirán más adelante. Es evidente que en este caso se obtienen señales relativamente más anchas en el espectro que en el caso del complejo formado con el tetrasacárido **3** (ambos con la misma secuencia) lo que pone de manifiesto la importancia de los grupos bencilo como grupos protectores en la interacción.

Nombre	$STD_0$ relativo/absoluto	Nombre	$STD_0$ relativo/absoluto
H2A	56/1.0	H3C	<b>100/1.8</b>
H3A	89/1.6	H3D	24/0.4
H5A	94/1.7	H4D	44/0.8
H1B	34/0.6	CH <sub>3</sub> -OMP	20/0.36
H2B	26/0.5	Bn	78/1.4
H3B	30/0.5		
H5B	37/0.7		
Ph-OMP	30/0.55		
Bn	48/0.9		

**Tabla 5.2.2.1** Valores de  $STD_0$  absolutos y relativos medidos a diferentes tiempos de saturación (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 s) para el tetrasacárido **2** a 298K y a 600 MHz.

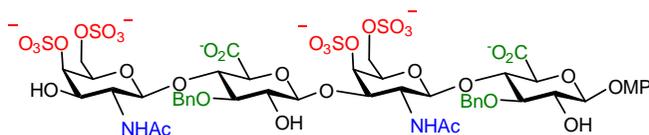
Si se analiza el mapa del epítipo (figura 5.2.2.4) obtenido de los valores de  $STD_0$  relativos para el mismo tetrasacárido estos están más dispersos, observándose tres rangos de saturación (0-30%, 30-70% y 70-100%) para los protones. Sin embargo, para el tetrasacárido **3**, con la misma secuencia y más grupos sulfato, prevalecía un solo rango (30-70%) lo que puede indicar un modo de unión diferente a la proteína pero con los datos obtenidos no se puede concluir con certeza. Si se analiza la saturación recibida por los grupos bencilos, se observa que al que se sitúa en el anillo de GlcA le llega más saturación, 78%, que al otro pero ambos grupos aromáticos participan en la interacción.



**Figura 5.2.2.4** Mapa del epítipo del tetrasacárido **2** obtenido a partir de los valores de STD<sub>0</sub>.

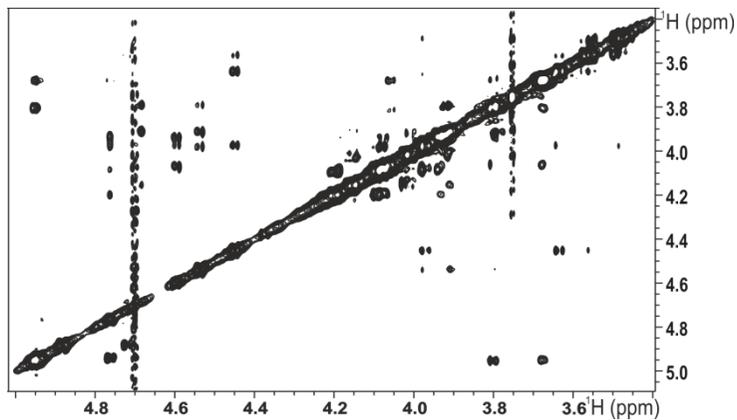
### Tetrasacárido 5.

El tetrasacárido **5** presenta una secuencia de CS tipo E con excepción de la adición de dos grupos bencilos en la posición 3 de los dos anillos de GlcA. El terminal no reductor en este caso no lleva un grupo sulfato residual (**figura 5.2.2.5**).



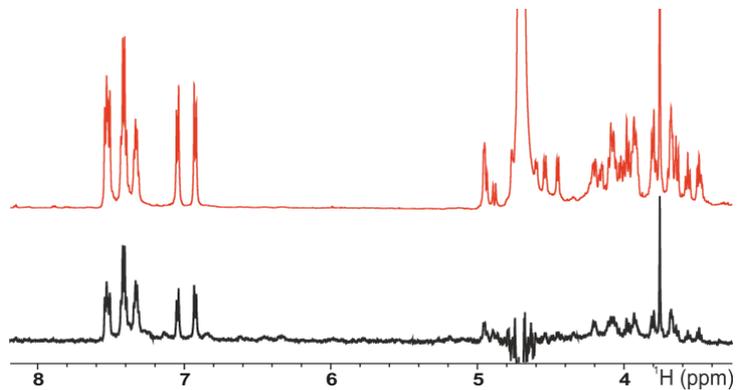
**Figura 5.2.2.5** Estructura del tetrasacárido **5** con secuencia CS normal con patrón de sulfatación tipo E más dos grupos bencilo.

En la siguiente figura se muestra el espectro 2D-NOESY obtenido a 200 ms para el complejo con el tetrasacárido **5** en presencia de la PTN (**figura 5.2.2.6**). En él se observan los picos de cruce H1/H3 y H1/H5 para los cuatro anillos, indicando que estos se encuentran en una conformación <sup>4</sup>C<sub>1</sub>. Los NOEs interresiduales obtenidos son los característicos de una estructura lineal extendida similares al mismo tetrasacárido en su forma libre. Por tanto, la interacción de este tetrasacárido con la PTN no muestra ningún cambio conformacional y está de acuerdo con la estructura tridimensional del ligando en su forma libre al igual que ocurría con la Midkina.



**Figura 5.2.2.6** Espectro 2D-NOESY transferido obtenido a 200 ms para el tetrasacárido **5** a 298K.

Los espectros de los experimentos de STD se muestran en la **figura 5.2.2.7** para el tetrasacárido **5**. En todos los casos se observa que se produce interacción entre el tetrasacárido y la PTN con una dispersión de la saturación recibida a prácticamente todos los hidrógenos del oligosacárido. Se observan señales claramente más anchas que el compuesto libre indicando una fuerte interacción dentro del complejo. De acuerdo con esta observación, en los experimentos de transferencia de saturación se observan señales poco intensas, lo que correspondería a un complejo cinético muy estable.



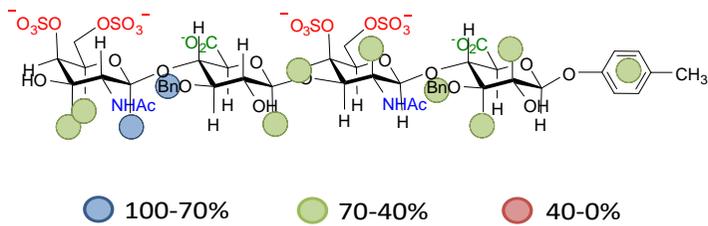
**Figura 5.2.2.7** Espectro de STD (negro) y  $^1\text{H}$ -RMN (rojo) obtenido con 16 escanes a 298K para el tetrasacárido **5**.

Los escasos valores de  $STD_0$  (**tabla 5.2.2.2**) que se han podido medir para el tetrasacárido **5** son relativamente bajos debido a la gran interacción producida entre el receptor y el ligando que ralentiza el equilibrio con el ligando en su forma libre. Se puede indicar que estos valores son ligeramente más elevados que los obtenidos para el tetrasacárido anterior (el 100% corresponde a un 3.1%) lo que en principio podría indicar una mayor interacción ya que los dos presentan un patrón de sulfatación tipo E y dos bencilos. Si se analizan los valores de inhibición (apartado 5.3) obtenidos por fluorescencia de polarización se observa que el tetrasacárido **5** presenta un  $IC_{50}$  ( ) mayor que el **2** ( ) indicando una menor interacción algo que no está totalmente de acuerdo con la interpretación más habitual de los valores de  $STD_0$ . Se debe de tener cuenta que para valores de constante de asociación tan bajos e interacciones tan fuertes no se puede demostrar una mayor o menor interacción en función de los valores de  $STD_0$ .

Nombre	$STD_0$ relativo/absoluto	Nombre	$STD_0$ relativo/absoluto
H2A	40/1.1*	H1C	30/0.9
H3A	40/1.1*	H1D	90/2.8
H2B	55/1.7	H3D	57/1.8
H4B	42/1.3	H5D	65/1.8
Ph-OMP	35/1.1		
Bn 2	40/1.2	Bn 1	<b>100/3.1</b>

**Tabla 5.2.2.2** Valores de  $STD_0$  absolutos y relativos para el tetrasacárido **5** con la Midkina medidos a 298K.

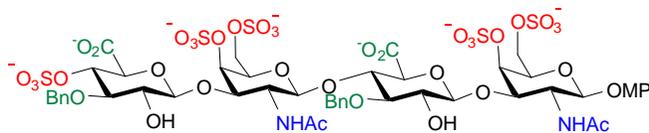
Si se analiza el mapa del epítipo (**figura 5.2.2.8**) parece indicar que este tetrasacárido podría mostrar un modo de unión diferente al anterior ya que los valores de  $STD$  medidos son más lineales (70-100%) llegándole más saturación sólo a los protones de un grupo bencilo y al H1D. A pesar de ello, no se puede llegar a concluir ningún modo de unión diferente ya que todos los valores son muy lineales indicando que la proteína interacción por todas partes del ligando y por los grupos bencilo. Si se analizan los grupos aromáticos, se observa que a los dos le llega saturación de la proteína obteniendo para uno de ellos un 100% de saturación lo que justifica su gran interacción con la PTN.



**Figura 5.2.2.8** Mapa del epítipo que representa dos rangos de  $STD_0$  relativos (30-70% y 70-100%) para el tetrasacárido **5**.

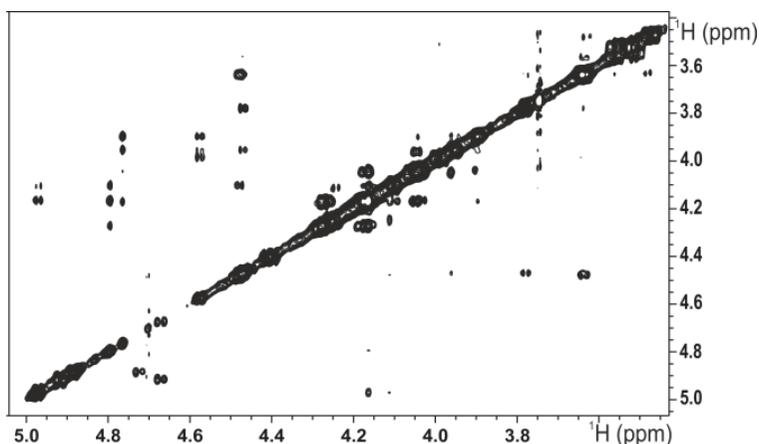
➤ **Tetrasacárido 8.**

La estructura del tetrasacárido **8** que presenta una secuencia CS alternada con un patrón de sulfatación tipo E con la excepción de un grupo sulfato adicional en posición 4 del anillo GlcA del extremo no reductor (D) y dos grupos bencilo en los anillos de GlcA, B y D (**figura 5.2.2.9**).



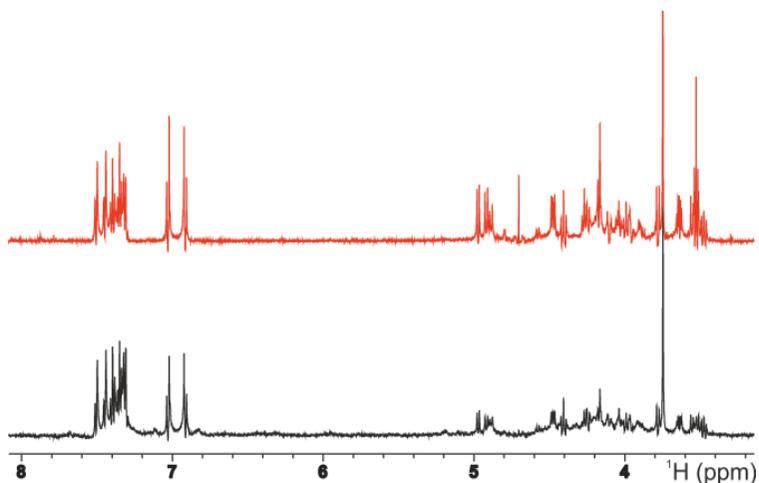
**Figura 5.2.2.9** Estructura del tetrasacárido **8** con secuencia CS alternada con patrón de sulfatación tipo E y un grupo sulfato adicional en posición 4 del extremo no reductor y dos grupos bencilo.

La **figura 5.2.2.10** muestra el espectro 2D-NOESY transferido para el tetrasacárido **8** en presencia de proteína. Para dicho tetrasacárido se observan los picos de cruce H1/H3 y H1/H5 característicos de una conformación  $4C_1$  para todos los anillos del carbohidrato. Adicionalmente, los NOEs interresiduales son consistentes con una geometría del enlace glicosídico *syn* lo que demuestra la linealidad de la estructura más estable. El análisis de este espectro indica que no se producen cambios estructurales del ligando evidentes cuando se une a la PTN y que se mantiene la estructura del ligando libre. Además esta estructura tridimensional es la misma que para el ligando complejado con la Midkina.



**Figura 5.2.2.10** Espectro bidimensional NOESY obtenido a 298 K para el tetrasacárido **8** a 16 escanes.

Los experimentos de STD para el tetrasacárido **8** se muestran en la **figura 5.2.2.11**. Al igual que en los demás casos, los espectros muestran una alta interacción para este tetrasacárido con la PTN. De acuerdo con el resto de los compuestos de la serie, en los espectros de STD se encuentran las mismas señales que para el espectro de referencia lo que indica un tipo de unión lineal sin regiones predominantes. En este caso, parece que las señales están menos agrupadas que en los casos anteriores, lo que podría indicar una cinética mayor para la formación del complejo que en los casos anteriores. Para obtener más información se llevó a cabo un análisis más exhaustivo midiendo los valores de  $STD_0$  absolutos y relativos (**tabla 5.2.2**.)



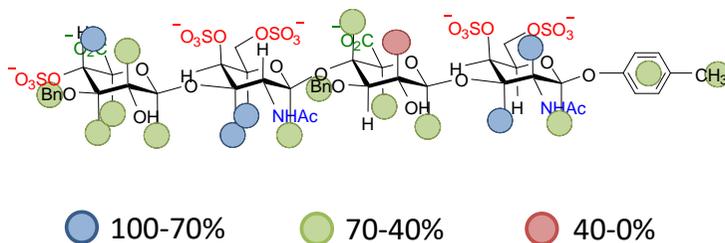
**Figura 5.2.2.11** Espectro de STD (negro) y  $^1H$ -RMN (rojo) realizado con 512 incremento de fides y 16 escanes a 298K para el tetrasacárido **8**.

Los valores de  $STD_0$  absolutos medidos son similares a los del caso anterior (tetrasacárido **5**) y ligeramente más altos que para el tetrasacárido **2** (100% equivale a un 3.0%) por lo que no se obtienen diferencias significativas con los anteriores.

Nombre	$STD_0$ relativo/absoluto	Nombre	$STD_0$ relativo/absoluto
H1A	36/1.1	H1C	56/1.7*
H2A	72/2.1	H3C	83/2.5
H3A	86/2.6	H5C	<b>100/3.0</b>
H1B	56/1.7*	H1D	41/1.2
H2B	14/0.4	H2D	40/1.2*
H4B	54/1.6	H3D	40/1.2*
H5B	44/1.3	H4D	75/2.3
Ph-OMP	46/1.4	H5D	49/1.5
Bn	64/1.9*	CH <sub>3</sub> -OMP	31/0.9
		Bn	64/1.9*

**Tabla 5.2.2.3** Valores de STD absolutos y relativos medidos para el complejo formado por el tetrasacárido **8** y la Pleiotrofina.

En cambio si se considera el mapa del epítipo (**figura 5.2.2.12**) para dicho tetrasacárido aparecen valores de  $STD_0$  relativos intermedios mostrando una mayor dispersión en los valores que en el caso anterior.. Sin embargo, esto no es suficiente para poder definir un modo de unión diferente al que ya se ha mencionado en todos los casos en el que el tetrasacárido se sitúa entre los dos dominios de la proteína. Se produce interacción entre la proteína y el ligando mediante los anillos aromáticos de igual forma que por los protones del esqueleto del carbohidrato.



**Figura 5.2.2.12** Mapa del epítipo que representa los valores de STD0 relativos para el tetrasacárido **8**.

Después del análisis de los tres tetrasacáridos dibencilados con la Pleiotrofina intentado obtener datos cuantitativos y evidencias cualitativas que informen del modo de unión y de la influencia de la secuencia se llega a deducir un modo de unión lineal para todos ellos envueltos por la proteína. Además, en dichas uniones proteína-ligando intervienen prácticamente todos los protones del carbohidrato y los grupos aromáticos con la misma intensidad, lo que pone de manifiesto la importancia de ambos en la interacción y, por tanto, la estabilidad de este complejo mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.

### **5.3 DATOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS MEDIANTE POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA.**

La polarización de fluorescencia permite medir con precisión las constantes de asociación entre proteínas de unión a GAG mediante un método puesto a punto en nuestro laboratorio, mediante competición entre una sonda fluorescente y el ligando que la desplaza. Se midieron los valores de  $IC_{50}$  de los seis complejos formados entre la Pleiotrofina y los oligosacáridos para llevar a cabo un análisis más exhaustivo de esta interacción. Estos valores indican la concentración de inhibidor necesaria para complejar a la proteína al 50%. Dichos datos de asociación se muestran en la **tabla 5.3.1** para los seis tetrasacáridos, ordenados primero los de los tetrasacáridos no proteger y después los dibencilados. Si analizamos esos datos se observa que los dos tetrasacáridos con un patrón de sulfatación tipo T (**3** y **10**) presentan un porcentaje de inhibición menor indicando mayor interacción con la proteína tal y como era de esperarse debido a las elevadas interacciones electrostáticas que pueden establecer con la proteína. Seguidos a estos están los tetrasacáridos dibencilados (protegidos) como era de esperarse debido a los grupos protectores que pueden interaccionar con los grupos hidrofóbicos de la PTN y, por último, se encuentra el tetrasacárido **7** que presenta menos grupos sulfato (CS tipo E) y ningún anillo aromático como grupo protector lo que provoca una menor interacción con la PTN. Aunque se pueden encontrar diferencias entre ellos se debe de destacar que todos los valores se encuentran en un rango de bajo micro molar por lo que todos los tetrasacáridos interaccionan de forma muy elevada con esta proteína. Además debido a la similitud de la Midkina y Pleiotrofina la tendencia encontrada en los valores de  $IC_{50}$  es la misma en ambos casos. Sin embargo, estos valores han sido obtenidos a partir de 250  $\mu$ M de proteína lo que significa que se han necesitado cantidades mayores

de GAGs para obtener los datos de inhibición, indicando de forma general una menor interacción para los GAGs que con la Midkina.

Tetrasacárido	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>3</b>	12
<b>7</b>	338
<b>10</b>	24
<b>2</b>	25
<b>5</b>	81
<b>8</b>	45

**Tabla 5.3.1** Representación de los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos a 250 μM de inhibidor analizados a partir de experimentos de Polarización de Fluorescencia.

#### **5.4 CONCLUSIONES.**

1. Al igual que la Midkina, la Pleiotrofina interacción con alta afinidad con los tetrasacáridos derivados de CS. Esto se aprecia en los valores de afinidad medidos por polarización de fluorescencia y en los espectros de <sup>1</sup>H-STD obtenidos que indican que la interacción es tan fuerte que se observan señales muy anchas y agrupadas con una relación señal-ruido muy pequeña debido al poco ligando en forma libre que se encuentra en disolución.

2. Las afinidades que presentan los complejos son bastantes diferentes tal y como se aprecia en los valores de IC<sub>50</sub>. Para una misma serie aumentan al aumentar la sustitución de grupos aromáticos.

3. La orientación que el ligando presenta en el sitio activo de la proteína no se ha podido determinar ya que los ligandos reciben magnetización en los STD a lo largo de toda su cadena y por todas direcciones. Aunque en algunos casos se han podido encontrar diferencias entre ellos, no han sido suficientes para determinar distintas estructuras de los complejos. Los resultados son consistentes con varias orientaciones de los ligandos cuando forman parte del complejo que reciban magnetización por todas sus caras. Por lo tanto, se asume como más probable un equilibrio entre varios modos de unión del ligando con diferentes orientaciones del ligando que en promedio recibiría magnetización por todas sus caras y anillos.

4. La estructura tridimensional de todos los ligandos cuando forman parte de los complejos es lineal y es igual a la del ligando en su forma libre. Por lo tanto, no se altera ni la conformación a nivel de los anillos ni a nivel global por variación en los enlaces glicosídicos.

## 5.5 PARTE EXPERIMENTAL.

Los experimentos de RMN se registraron en un equipo BRUKER 600 AVANCE III HD con un imán ASCEND equipado con una criosonda QCI S3 H/F-C/N-D 05-Z. El espectrómetro de 600 MHz está en la Plataforma de Interacciones Biomoleculares del cicCartuja (CSIC/USE).

Las estructuras de los ligando libres han sido resueltas en el capítulo 4. Para elucidar las estructuras de los complejos formados por los diferentes tetrasacáridos con la PTN fue necesaria la realización de experimentos de RMN de transferencia de magnetización: STD y NOESY transferido se emplearon las secuencias con las versiones sensibles a la fase, con selección por gradientes de la magnetización de la biblioteca de Bruker siempre que fuese posible. Las muestras preparadas para este propósito mostraban todas la misma relación proteína-ligando, 1:50 (1 mM de ligando y 20  $\mu$ M de proteína en 250  $\mu$ L de buffer 1xPBS).

En los experimentos NOESY transferido se aplicó un filtro para la supresión de los artefactos de cero cuanto consistente en un pulso con barrido de frecuencias de 180° con un gradiente simultáneo<sup>35</sup> junto con un pulso de 180° flanqueado por gradientes de campo para desfase de la magnetización no deseada.<sup>36,37</sup>

En algunos casos se emplearon las versiones monodimensionales de los experimentos NOESY por selección con DPGSE y seguido por la secuencia de mezcla

---

<sup>35</sup> M. J. Thrippleton, J. Keeler, *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *115*, 4068.

<sup>36</sup> R. Wagner, S. Berger, *Journal of Magnetic Resonance* **1996**, *123 A*, 119.

<sup>37</sup> J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*, 4546.

correspondiente.<sup>38,39,40</sup> Este experimento se realizó para todos los complejos formados con la PTN a 200 ms de tiempo de mezcla y con 512 incrementos de fides y 4k de puntos complejos para todos los tetrasacáridos excepto para el **3** que se llevó a cabo con 432 incrementos de fides y 4k de puntos complejos y el **10** realizados con 360 incrementos de fides y 4k de puntos complejos. Todos se llevaron a cabo con 16 acumulaciones por incremento y con un tiempo de mezcla de 200 ms para todos los complejos.

Los experimentos de espectroscopia de RMN de transferencia de saturación (STD) se adquirieron empleando las secuencias de la librería de pulsos del fabricante del equipo. Salvo que se especifique lo contrario, se usó una secuencia con saturación durante el tiempo de relajación mediante un tren de pulsos gaussianos de baja potencia de 50 ms de longitud separados por un intervalo de 1ms, precedido por un módulo de purga para eliminar magnetización residual del escan previo. Tras el módulo de excitación se destruye la magnetización residual de la proteína con un bloqueo de espines. Finalmente, cuando fue necesario se aplicó supresión del disolvente por “*excitation sculpting*”<sup>41, 42,43</sup> salvo para los tetrasacáridos **7** y **8** con los que se empleó saturación de la señal del agua durante el tiempo de mezcla. Todos los experimentos fueron llevados a cabo irradiando a 0.7 y 40 ppm. Los tiempos de saturación habituales fueron 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 s. Los experimentos *on* y *off resonance* se adquirieron en escanes alternos y almacenaron independientemente.<sup>44, 45,46</sup> Con ambos programas se registraron con una fid de 16k de puntos y 1024 acumulación por incrementos.

---

<sup>38</sup> M. J. Thrippleton, J. Keeler, *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *115*, 4068.

<sup>39</sup> J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*, 4546.

<sup>40</sup> R. Wagner, S. Berger, *Journal of Magnetic Resonance* **1996**, *123 A*, 119.

<sup>41</sup> M. Mayer, B. Meyer, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 1784.

<sup>42</sup> M. Mayer, B. Meyer, *Angewandte Chemie* **1999**, *111*, 1902.

<sup>43</sup> T.L. Hwang, A.J. Shaka, *Journal of Magnetic Resonance* **1995**, *112 A*, 275.

<sup>44</sup> M. Mayer, B. Meyer, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 1784.

<sup>45</sup> M. Mayer, B. Meyer, *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *111*, 1902.

<sup>46</sup> T. L. Hwang, A. J. Shaka, *Journal of Magnetic Resonance* **1995**, *112*, 275.

## **CONCLUSIONES**

## 6.1 INTERACCIÓN DE GAGs DERIVADOS DE HEPARINA CON FGF-1 Y LANGUERINA.

1. El análisis de los experimentos de STD se ha realizado mediante la construcción de la curva de crecimiento de STD con el tiempo de irradiación para obtener los valores de  $STD_0$ . En los ocho casos se aprecia saturación transferida del FGF-1 a los trisacáridos signo inequívoco de interacción. La extensa dispersión de valores de magnetización transferida a lo largo de la cadena es compatible con un modo de interacción extendido de los carbohidratos sobre la superficie de la proteína.

2. Los valores de STD son bajos o moderados complicando el análisis de los posibles modos de asociación. Ello probablemente se deba a la distancia tan larga que existe entre las cadenas laterales cargadas positivamente del FGF y los grupos sulfato negativos de los carbohidratos lo que provoca que los hidrógenos del carbohidratos reciban poca saturación desde la proteína.

3. Mediante NOESY transferido se ha podido deducir que la estructura tridimensional de los trisacáridos dentro del complejo con FGF-1 son iguales a las deducidas previamente para los mismos en estado libre y que son compatibles con las de numerosos complejos con heparina y análogos.

4. Las constantes de disociación de la quimioteca de trisacáridos se han calculado mediante monitorización de la variación de los  $T_1$  selectivos con la adición de ligando para las señales de los protones anoméricos. Este método tiene como principal ventaja frente a la valoración del  $STD_0$  el ser experimentalmente más rápido y preciso. Además, la cantidad de muestra utilizada para estos experimentos era sustancialmente más baja que por el método del STD.

5. Los valores de afinidad de la serie 1 se pueden justificar considerando que **1** puede interaccionar con FGF usando ambas caras, mientras que **4** sólo lo puede conseguir por una de sus caras ya que no presenta grupos sulfato en la cara que no interaccionaría con la proteína. Al considerar **2** y **3** se puede deducir que el grupo sulfato en la posición 6 del anillo C tiene una mayor influencia en la interacción.

6. Mediante cálculos de docking usando Glide sin restricciones espaciales rigurosas se ha observado que la mayor afinidad de **7** y **8** podrían estar justificadas por la

existencia de nuevas zonas de interacción no accesibles para los compuestos de la serie 1 en nuevas regiones del espacio alejadas del centro canónico de interacción.

## **6.2 INTERACCIÓN DE GAGs (TETRASACÁRIDOS Y DISACÁRIDOS) CON MIDKINA.**

Primero, se van a mencionar las conclusiones para el estudio realizado para los tetrasacáridos libres:

1. Se ha realizado el estudio de la estructura en disolución de los tetrasacáridos libres, dibencilados y persustituidos. En general los anillos de GlcNA y de GlcA se encuentran en conformación silla  ${}^4C_1$  mientras que los residuos de IdoA terminales están en un equilibrio rápido en la escala de tiempo de desplazamientos químico entre las conformaciones  ${}^2S_0$  y  ${}^1C_4$ , deducido por la presencia de un NOE característico y los valores intermedios de las  ${}^3J_{HH}$ . Los ángulos glicosídicos, con geometrías tipo syn- $\Psi$  son compatibles con estructuras globales extendidas.

2. El estudio ha continuado con la simulación mediante dinámica molecular de los compuestos. En el caso de los derivados con sustituyentes bencilo, sólo cuando se aplicaron métodos de restricciones promediadas en el tiempo se obtuvieron resultados que eran capaces de justificar las observaciones experimentales.

3. Los tetrasacáridos perprotegidos mostraron, lógicamente, poca solubilidad en disolución acuosa, no obstante, su alta densidad de carga les hace parcialmente solubles en agua. Al destruir los agregados formados por dilución se ha podido realizar estudios parciales de uno de ellos con resolución comparable a los compuestos con hidroxilos.

Segundo, se van a mencionar las conclusiones obtenidas para el estudio realizado con los complejos formados por los tetrasacáridos.

1. La conformación de los tetrasacáridos en su forma enlazada y libre son iguales y compatibles con una estructura tridimensional lineal y extendida.

2. La interacción de los tetrasacáridos con Midkina no pudo ser justada a un único modo de unión. En general este sería compatible con una unión de la proteína alrededor de un núcleo central de tetrasacárido en disposición lineal o también como la inserción del carbohidrato en un bucle formado al aproximarse los dos dominios que incluye al

dominio flexible entre los dominios. Este sería compatible con las estructuras predichas mediante cálculos de docking de diferente nivel de precisión. En estos complejos predominan las interacciones carga – carga entre la Midkina y los todos los tetrasacáridos.

3. Los valores de  $IC_{50}$  de los compuestos bencilados se corresponden con una mayor interacción con Midkina que sus homólogos sin bencilar. La hipótesis más probable para justificar este hecho es la existencia de interacciones adicionales aromático – aromático o  $\pi - \pi$ , que estabilizarían la formación de los complejos de compuestos bencilados frente a los libres.

4. Finalmente, para el caso de los compuestos los cuales presentan todas las posiciones sustituidas por grupos bencilo o benzoilo, se ha detectado un gran aumento en la afinidad por Midkina. Además también se ha determinado que a concentraciones de 1mM como las usadas para los estudios del resto de los oligosacáridos se encuentran formando agregados que se disgregan al diluir. En el caso de **9** fue posible conseguir concentración del ligando libre monomérico para realizar el estudio de STD que tan solo pudo ser cualitativo debido al solapamiento de señales.

Las conclusiones para los disacáridos tanto en su forma libre como en su forma complejada son bastantes parecidas a las de los tetrasacáridos de CS e híbridos y son expuestas a continuación:

1. Al cambiar la relación entre grupos sulfato/grupos hidrofóbicos de los disacáridos es más acusado el hecho de la agregación hasta tal punto que a concentraciones bajas ha sido imposible la realización del análisis cualitativo de la estructura libre (disacárido **14**). Cuando los disacáridos presentan más grupos aromáticos este efecto es más acusado. Si se compara el disacárido **15** con su correspondiente pentasacárido se observa como al aumentar la longitud y por lo tanto, aumentar los grupos sulfato, se produce el aumento de la solubilidad, la disminución del agregado y a concentraciones normales de trabajo se puede determinar una estructura tridimensional bastante fiable.

2. Con las condiciones de muestras adecuadas el análisis cualitativo reveló que la secuencia disacáridica es lineal y la conformación de los anillos es  ${}^4C_1$  como era de esperar. Al igual que para el pentasacárido. Debido a los escasos valores cuantitativos no se han podido llegar a cabo las DM con restricciones promediadas en el tiempo para

complementar los valores experimentales y obtener una estructura teórica. Los resultados de la DM libres reproducen mejor los datos experimentales cuando los disacáridos presentan un anillo con grupos sulfato y el otro anillo sin ninguno independientemente de la secuencia. Este efecto se puede explicar debido a una inestabilidad de las cargas. Aunque reproduce la conformación mayoritaria de los anillos no reproduce la linealidad estructural con un único mínimo energético en la trayectoria ( $\Phi/\Psi$ ).

3. Después de los valores de  $STD_0$  obtenidos para cada disacárido no se observan diferencias en el modo de unión de los disacáridos con la Midkina ya que se orientan entre ambos dominios de la Midkina. Sí es evidente que al presentar una secuencia diferente a los tetrasacáridos y una longitud más pequeña la interacción es más pequeña que para los tetrasacáridos persustituidos pero más alta que los desprotegidos.

4. La realización del docking molecular llevado a cabo con las mismas condiciones de grid y de docking que los tetrasacáridos confirma las diferentes estructuras obtenidas las cuáles no indican un único modo de unión con la Midkina.

### **6.3 PLEIOTROFINA**

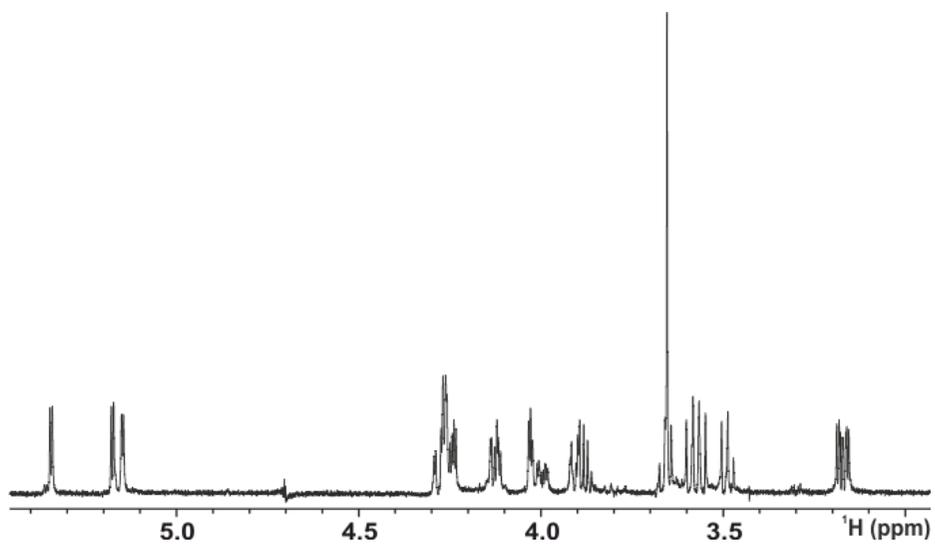
1. Al igual que la Midkina, la Pleiotrofina interacciona con alta afinidad con los tetrasacáridos derivados de CS. Esto se aprecia en los valores de afinidad medidos por polarización de fluorescencia y en los espectros de RMN obtenidos que indican que la interacción es tan fuerte que se observan señales muy anchas y agrupadas con una relación señal-ruido muy pequeña debido al poco ligando en forma libre que se encuentra en disolución.

2. Las afinidades que presentan los complejos son bastantes diferentes tal y como se aprecia en los valores de  $IC_{50}$ . En general, para una misma serie aumentan al aumentar la sustitución de grupos aromáticos.

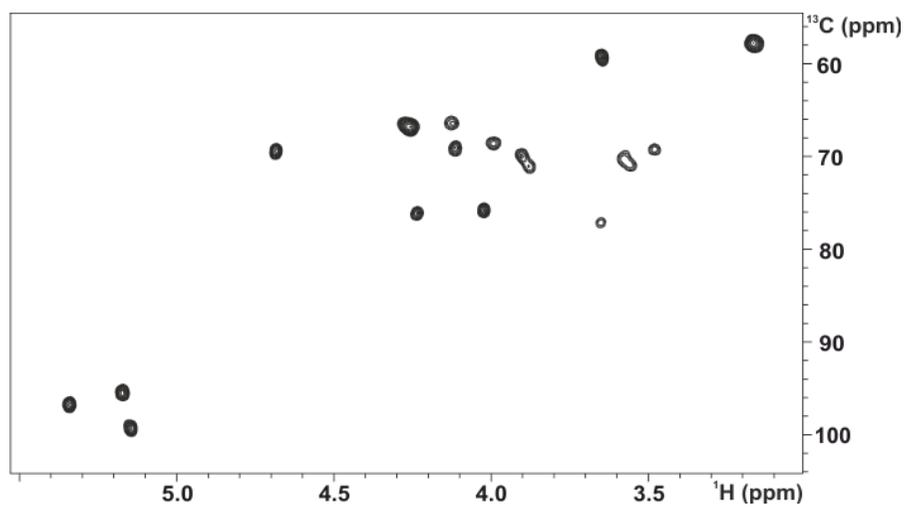
3. No se ha podido determinar la orientación del ligando en el sitio activo de la proteína, aunque se ha podido determinar que los ligandos reciben magnetización en los STD a lo largo de toda su cadena y por todas direcciones. Lo que estaría de acuerdo con un modo de asociación análogo al descrito para los mismos carbohidratos y la Midkina siendo consistentes con una situación central del oligosacárido que es rodeado por la PTN interaccionando con los dominios por direcciones opuestas.

4. La estructura tridimensional de todos los ligandos cuando forman parte de los complejos es lineal es igual a la del ligando en su forma libre, no se altera ni la conformación a nivel de los anillos ni a nivel global por variación en los enlaces glicosídicos.

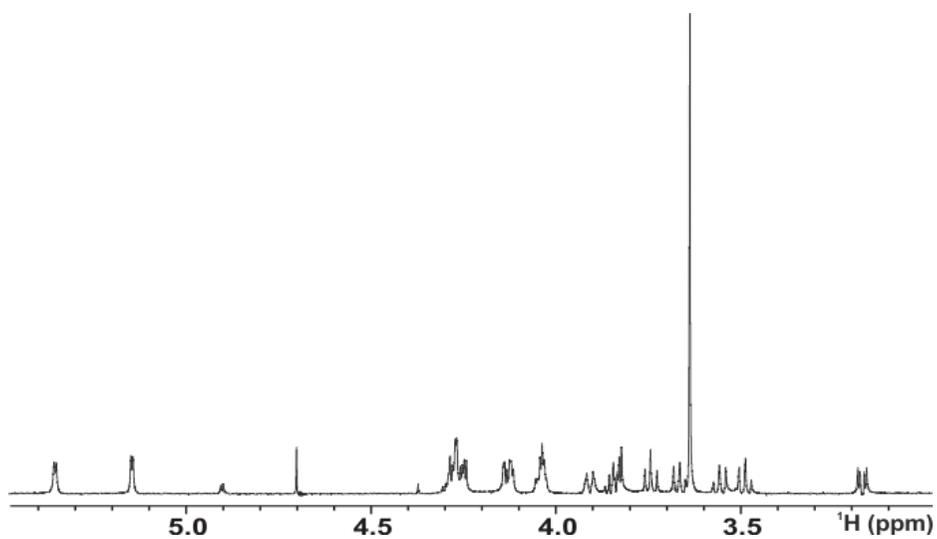
## **ANEXO**



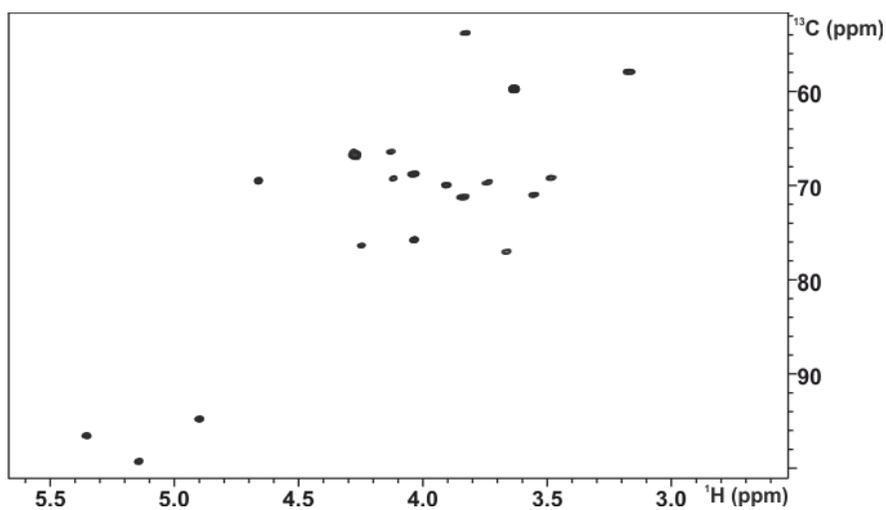
Espectro monodimensional obtenido a 298K para el trisacárido **1**.



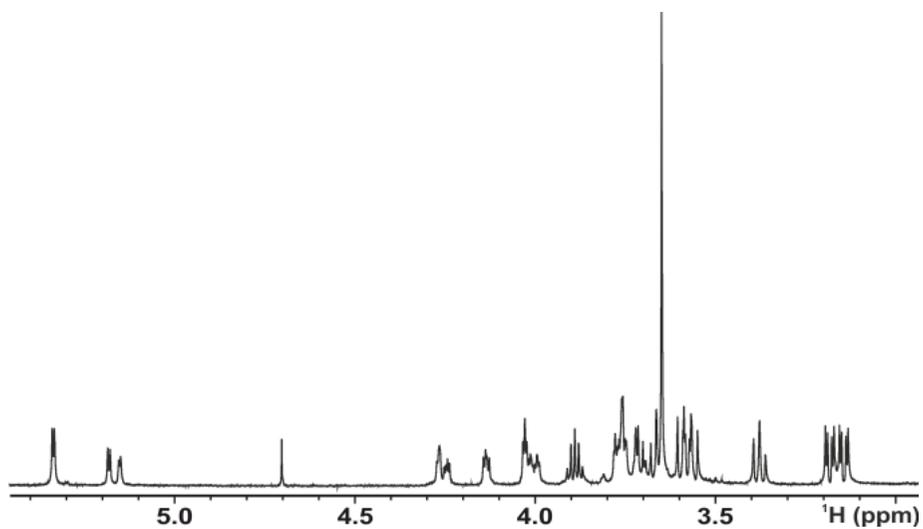
Espectro bidimensional HSQC obtenido para el trisacárido **1**.



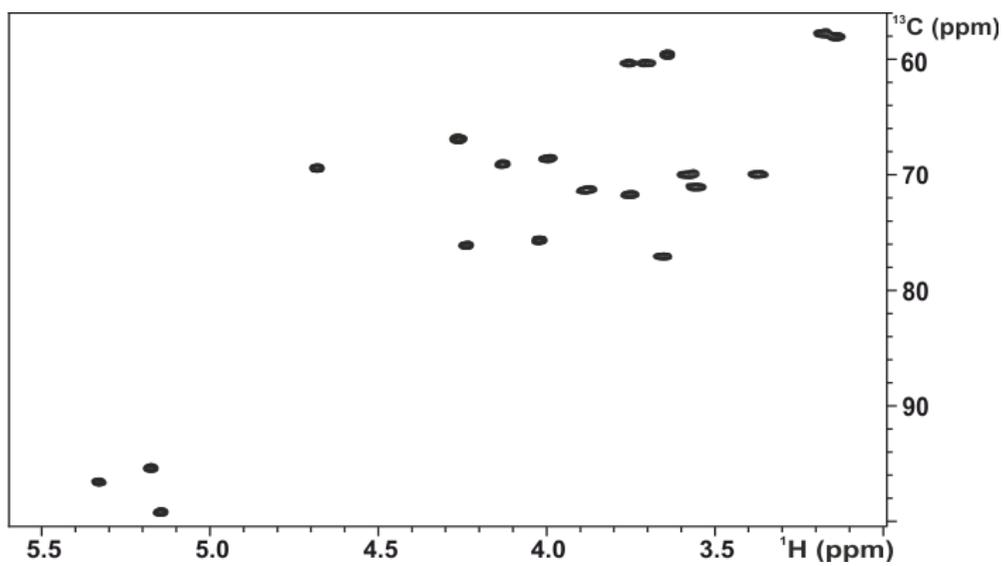
Espectro monodimensional obtenido a 298K para el trisacárido **2**.



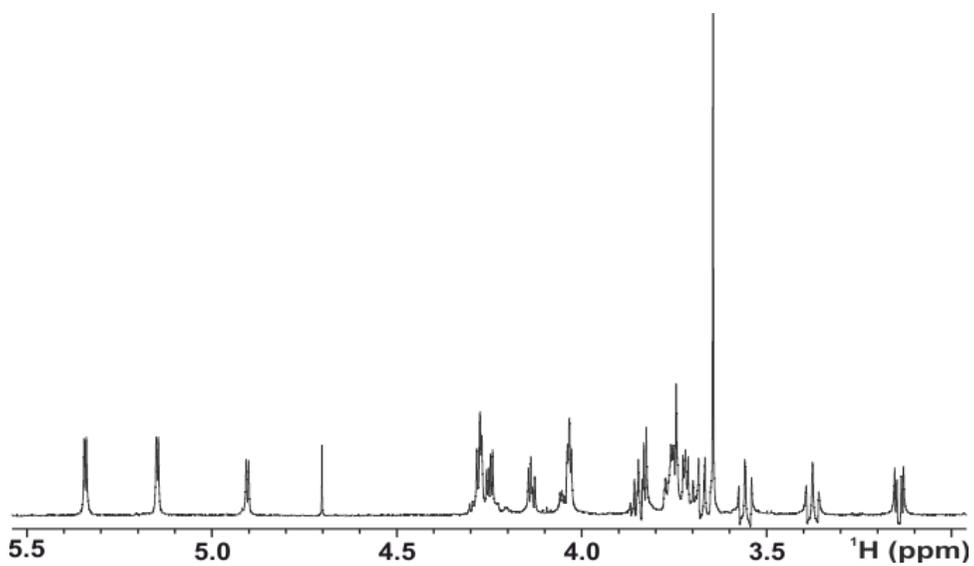
Espectro bidimensional HSQC obtenido para el trisacárido **2**.



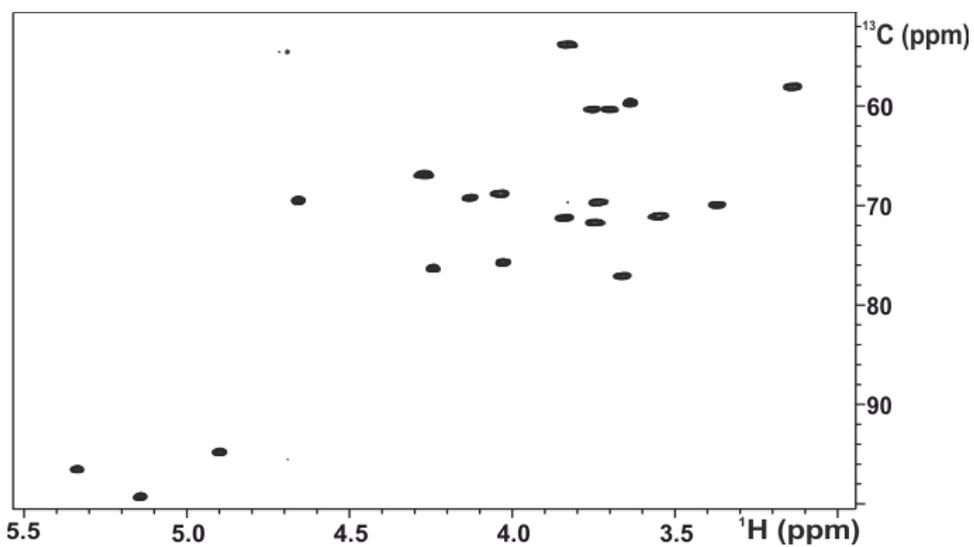
Espectro monodimensional obtenido a 298K para el trisacárido **3**.



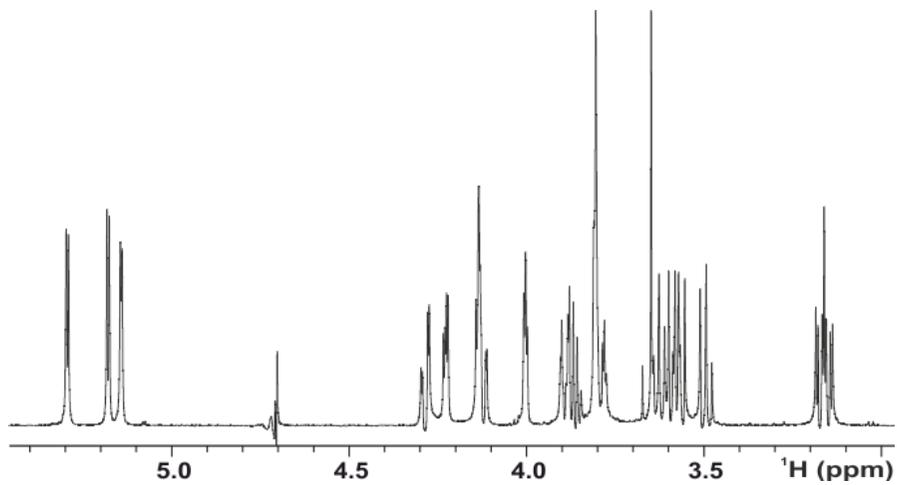
Espectro bidimensional HSQC obtenido para el trisacárido **3**.



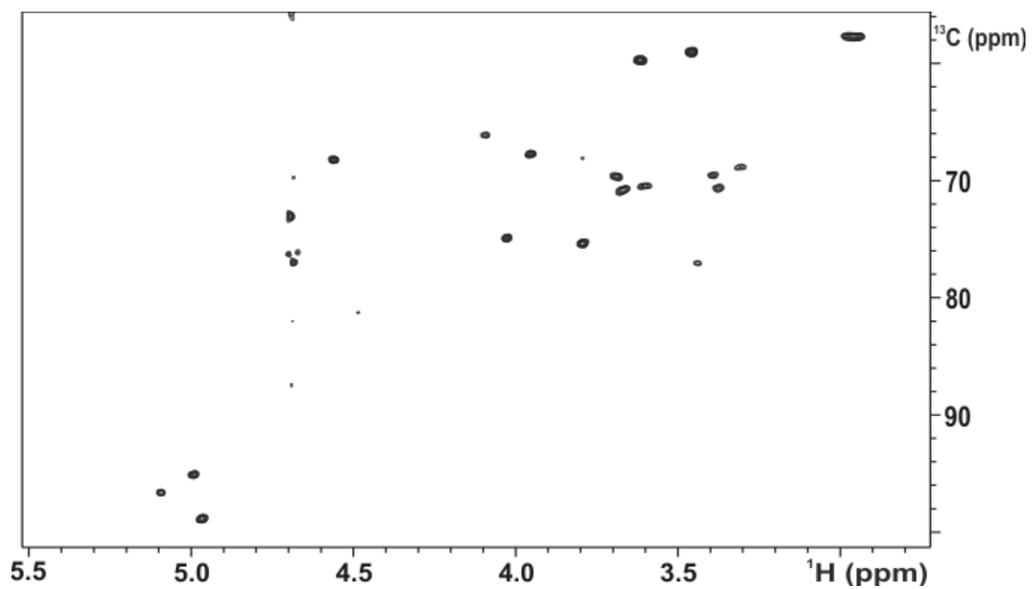
Espectro monodimensional obtenido a 298K para el trisacárido 4.



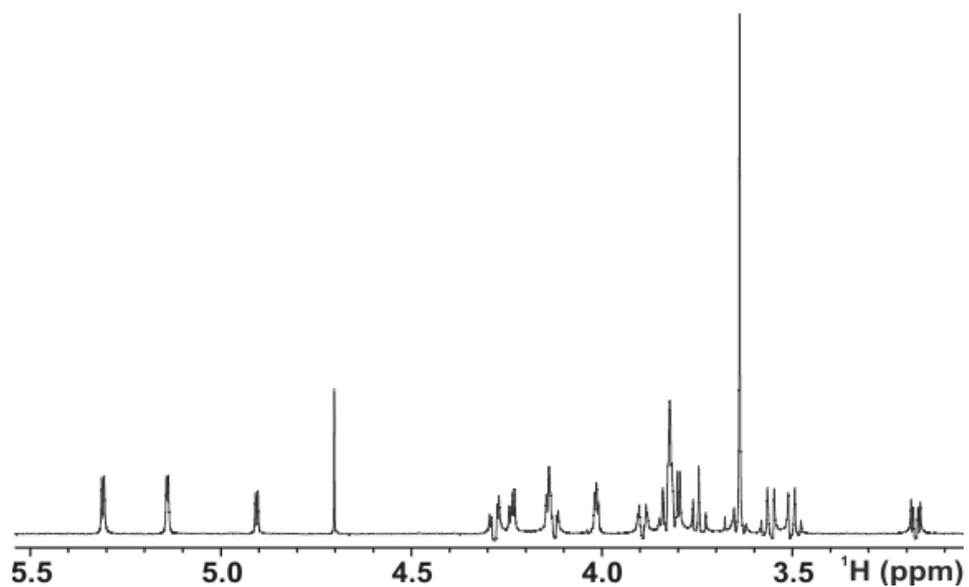
Espectro bidimensional HSQC obtenido para el trisacárido 4.



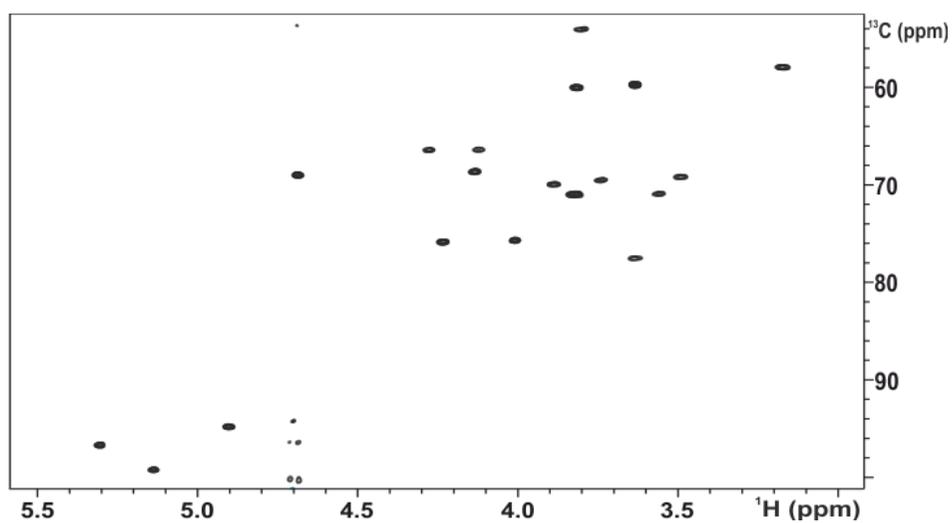
Espectro monodimensional obtenido a 298K para el trisacárido 5.



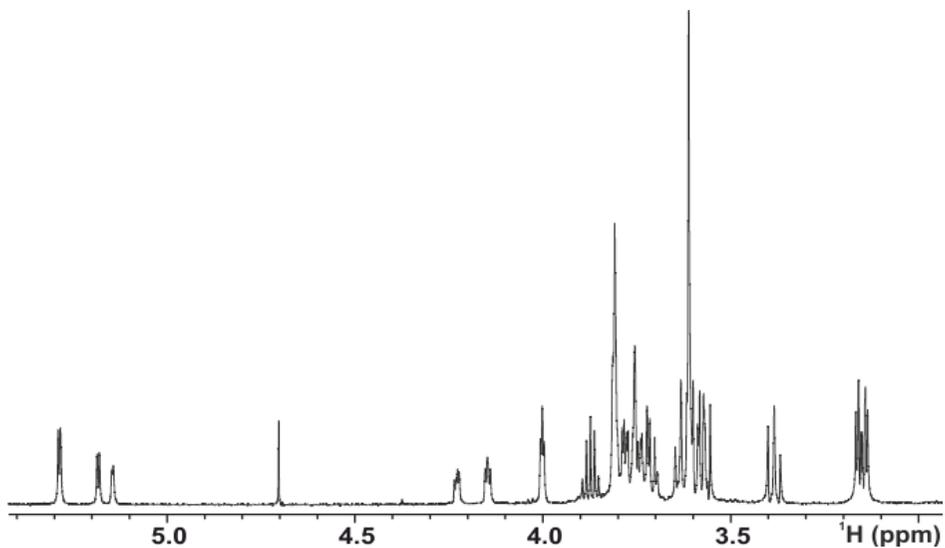
Espectro bidimensional HSQC obtenido para el trisacárido 5.



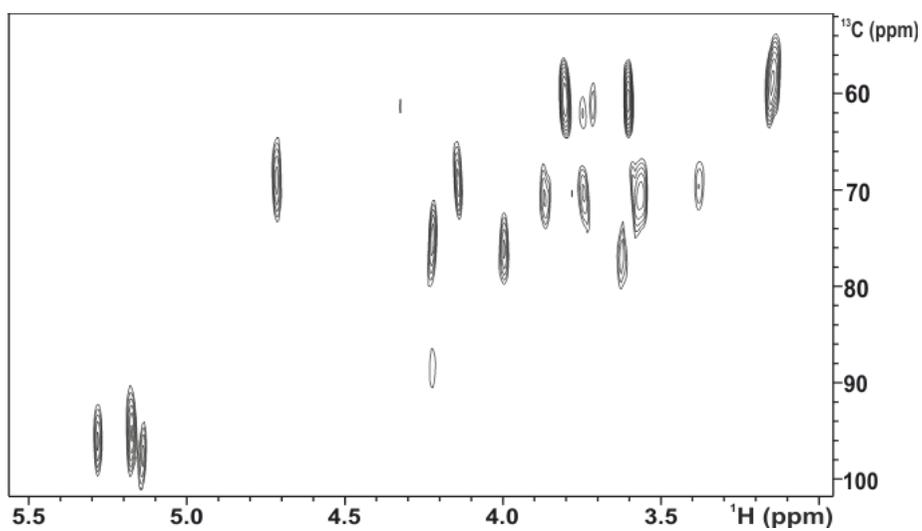
Espectro monodimensional obtenido a 298K para el trisacárido **6**.



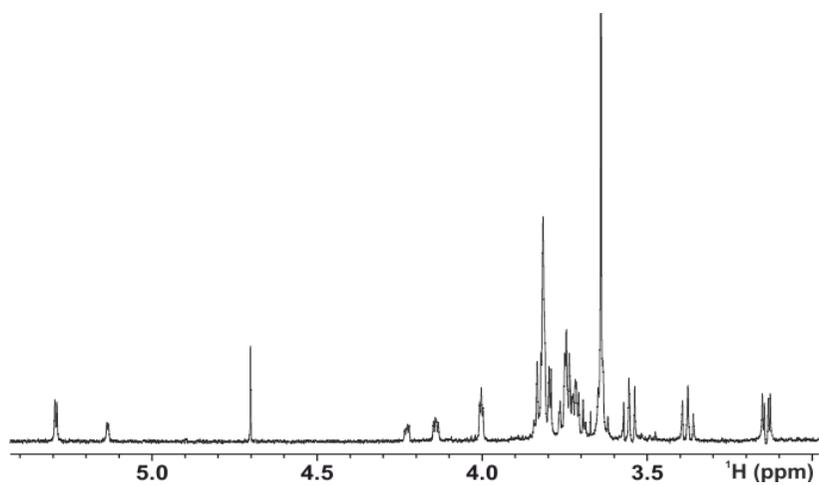
Espectro bidimensional HSQC obtenido para el trisacárido **6**.



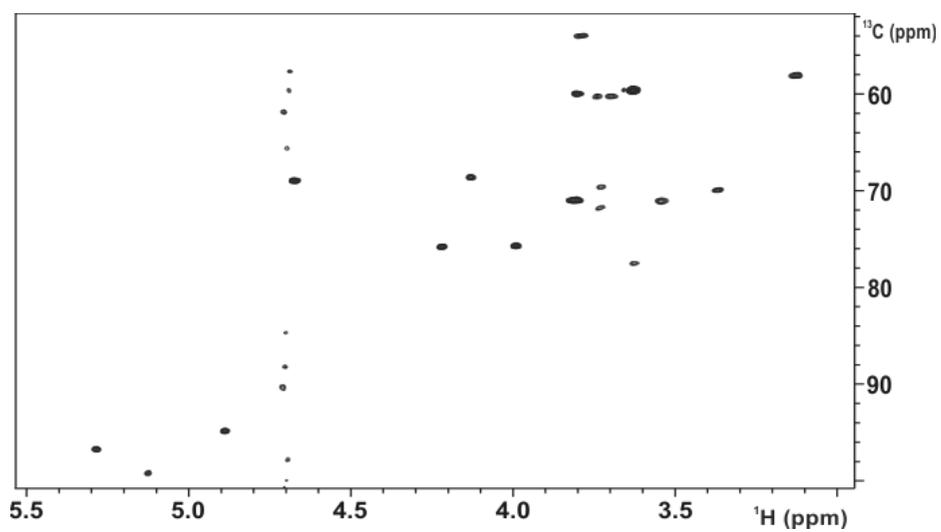
Espectro monodimensional obtenido a 298K para el trisacárido 7.



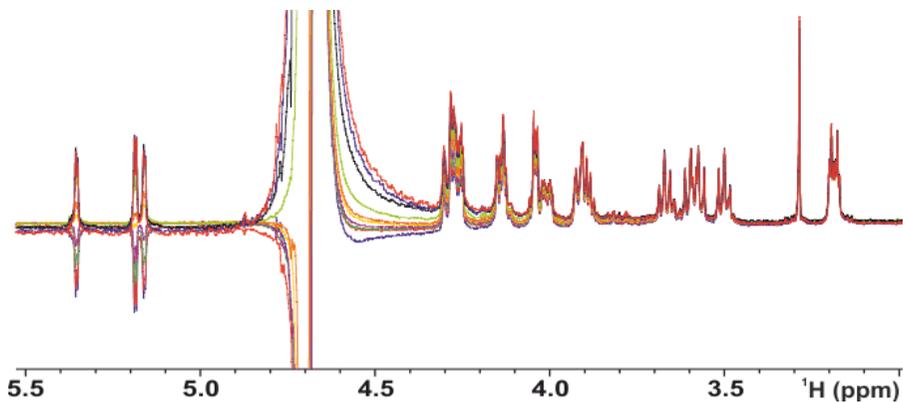
Espectro bidimensional HSQC obtenido para el trisacárido 7.



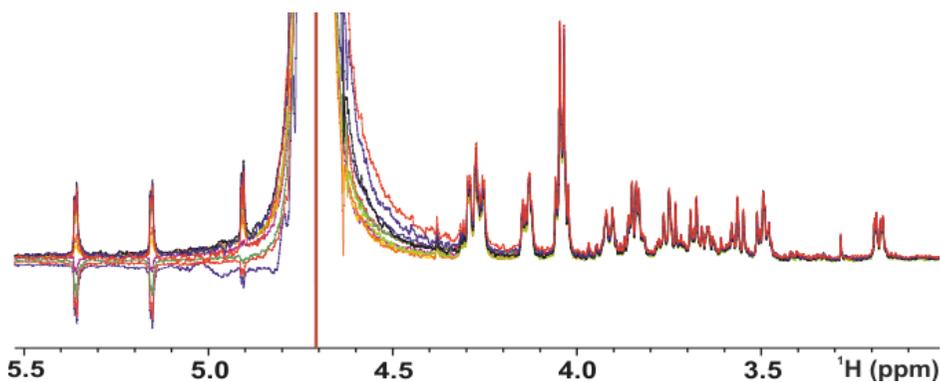
Espectro monodimensional obtenido a 298K para el trisacárido **8**.



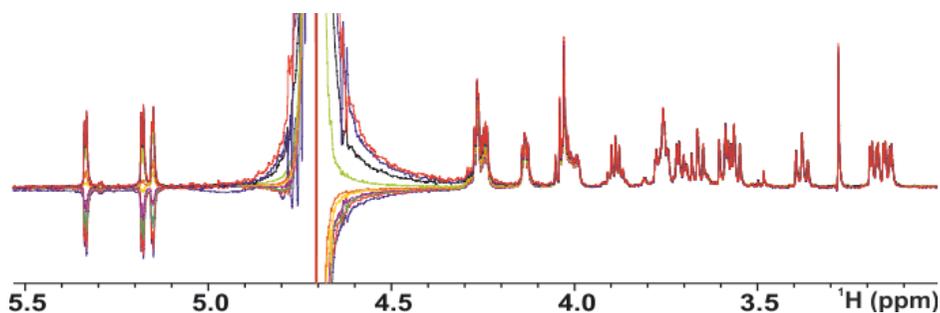
Espectro bidimensional HSQC obtenido para el trisacárido **8**.



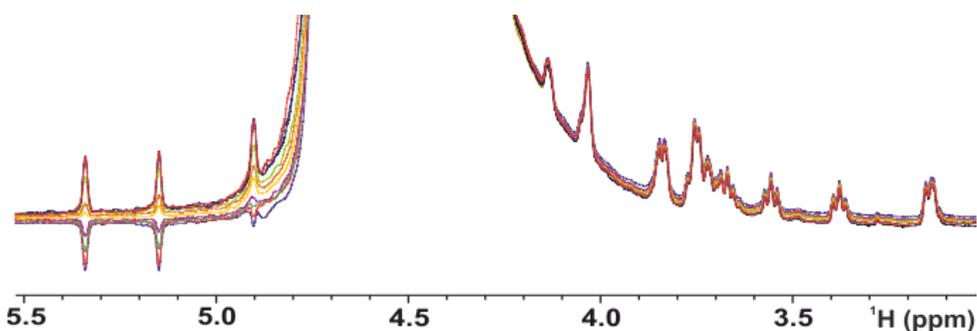
Representación de los espectros de relajación del T<sub>1</sub> selectivo obtenidos para el trisacárido **1** medidos a 298K y con una concentración de 480 μM de ligando y 19 μM de FGF-1



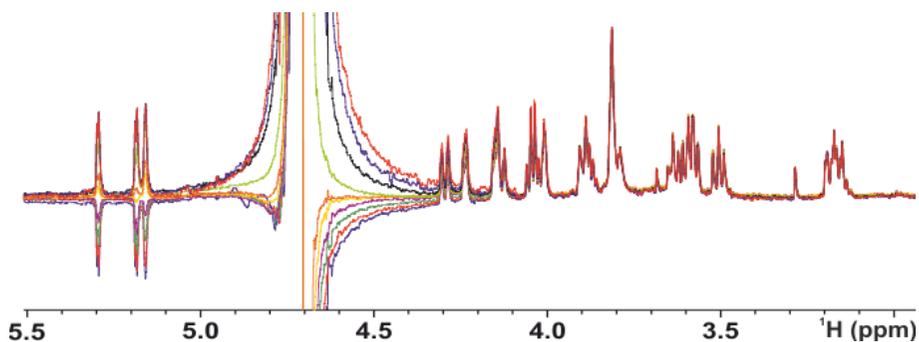
Representación de los espectros de relajación del T<sub>1</sub> selectivo obtenidos para el trisacárido **2** medidos a 298K y con una concentración de 480 μM de ligando y 19 μM de FGF-1.



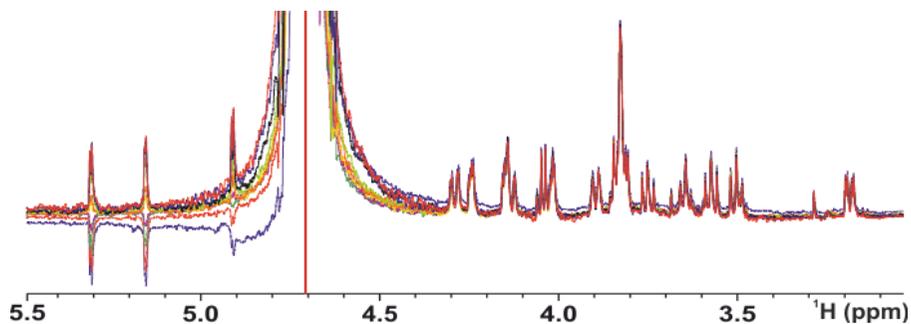
Representación de los espectros de relajación del T<sub>1</sub> selectivo obtenidos para el trisacárido **3** medidos a 298K y con una concentración de 480 μM de ligando y 19 μM de FGF-1.



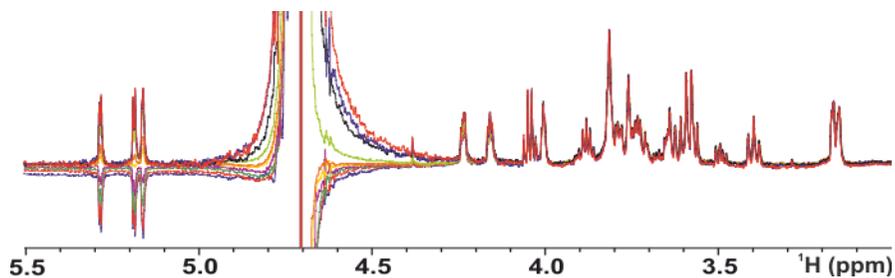
Representación de los espectros de relajación del  $T_1$  selectivo obtenidos para el trisacárido **4** medidos a 298K y con una concentración de 480  $\mu\text{M}$  de ligando y 19  $\mu\text{M}$  de FGF-1.



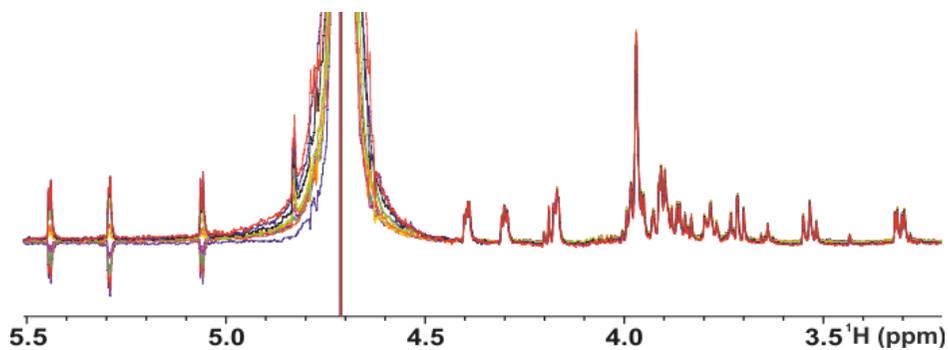
Representación de los espectros de relajación del  $T_1$  selectivo obtenidos para el trisacárido **5** medidos a 298K y con una concentración de 480  $\mu\text{M}$  de ligando y 19  $\mu\text{M}$  de FGF-1.



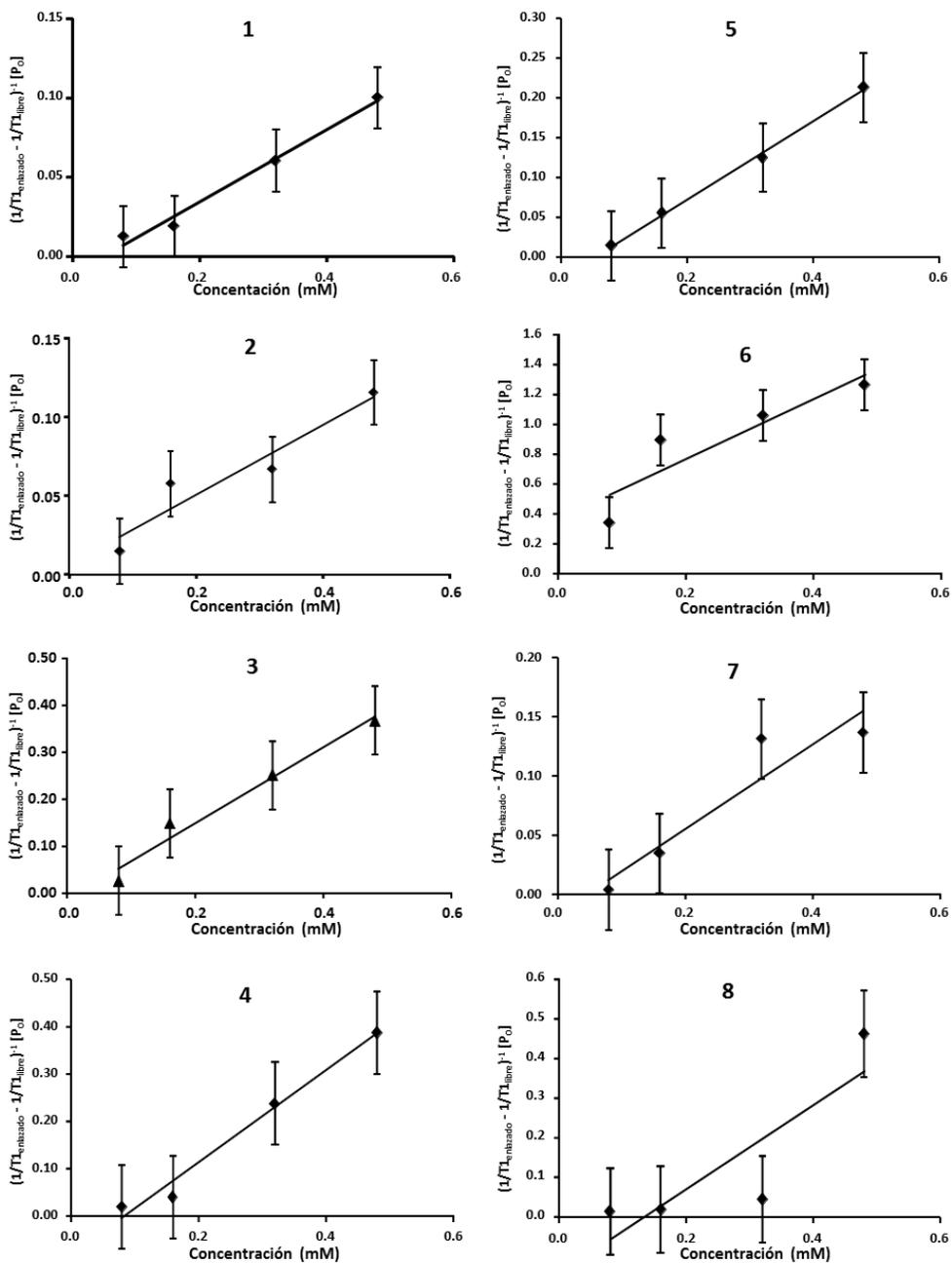
Representación de los espectros de relajación del T<sub>1</sub> selectivo obtenidos para el trisacárido **6** medidos a 298K y con una concentración de 480 μM de ligando y 19 μM de FGF-1.



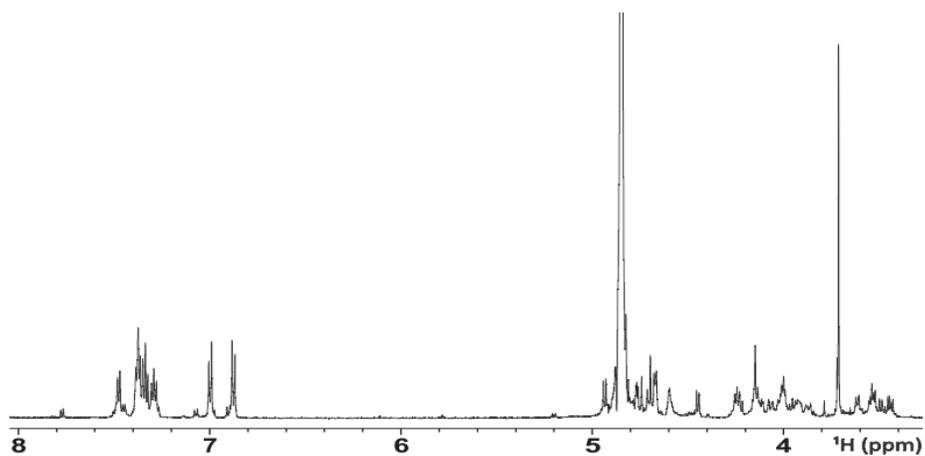
Representación de los espectros de relajación del T<sub>1</sub> selectivo obtenidos para el trisacárido **7** medidos a 298K y con una concentración de 480 μM de ligando y 19 μM de FGF-1.



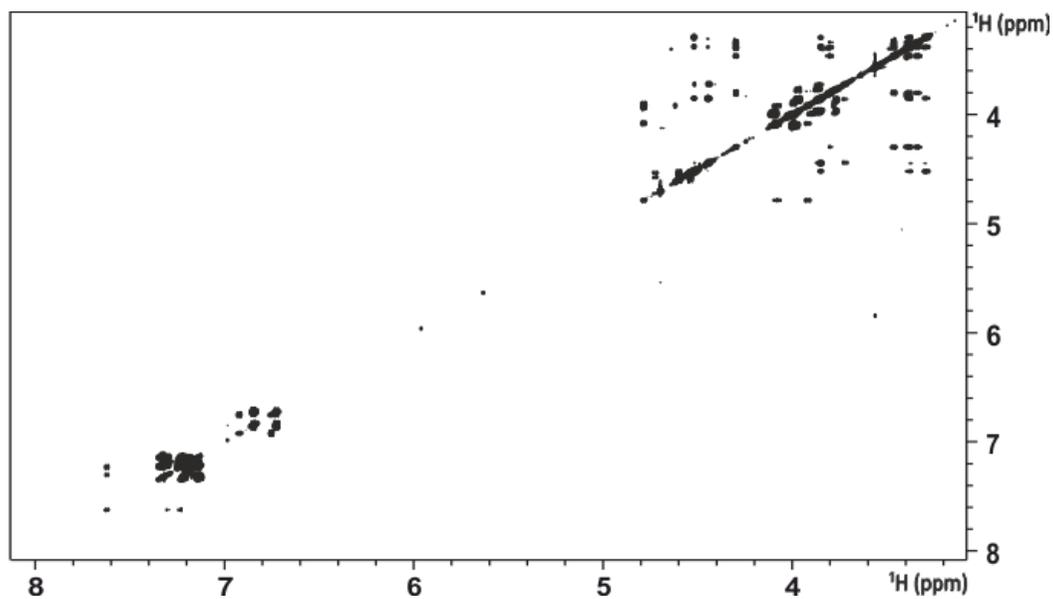
Representación de los espectros de relajación del T<sub>1</sub> selectivo obtenidos para el trisacárido **8** medidos a 298K y con una concentración de 480 μM de ligando y 19 μM de FGF-1.



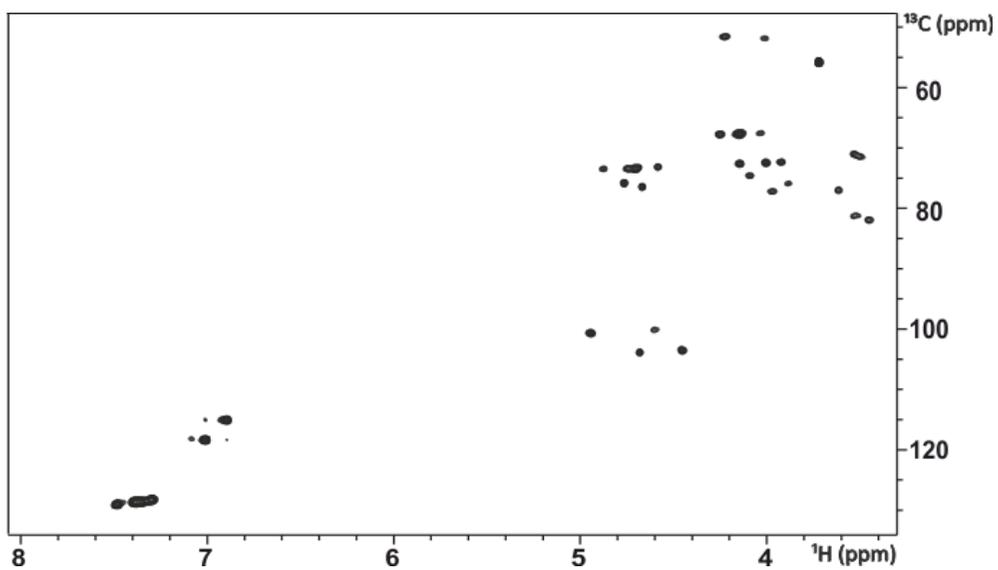
Representación de los espectros de relajación del  $T_1$  selectivo obtenidos para el trisacárido **8** medidos a 298K y con una concentración de 480  $\mu\text{M}$  de ligando y 19  $\mu\text{M}$  de FGF-1.



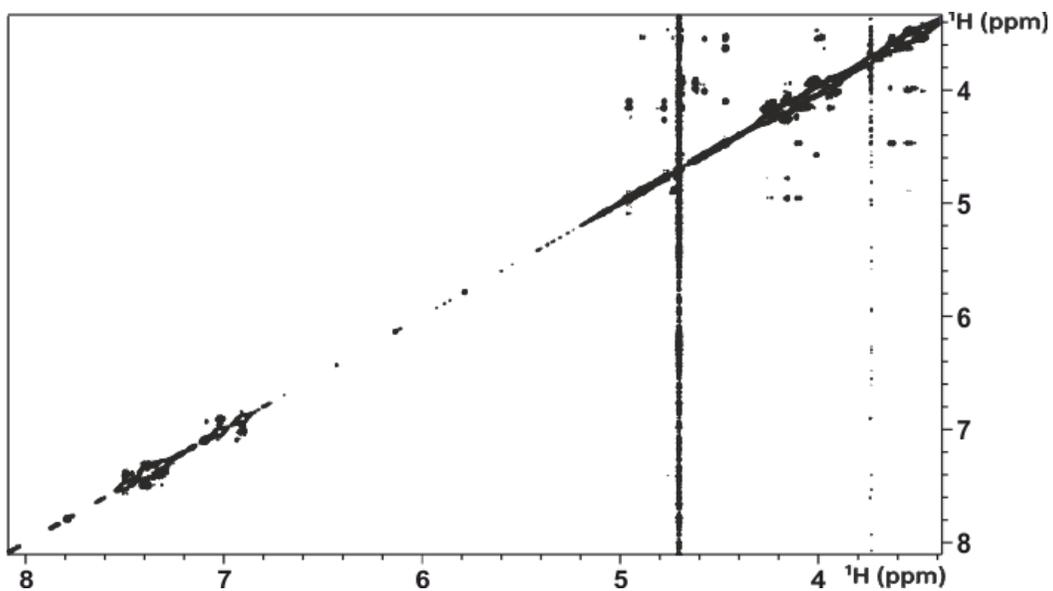
Espectro monodimensional para el tetrasacárido **2** a 298K y 600 MHz.



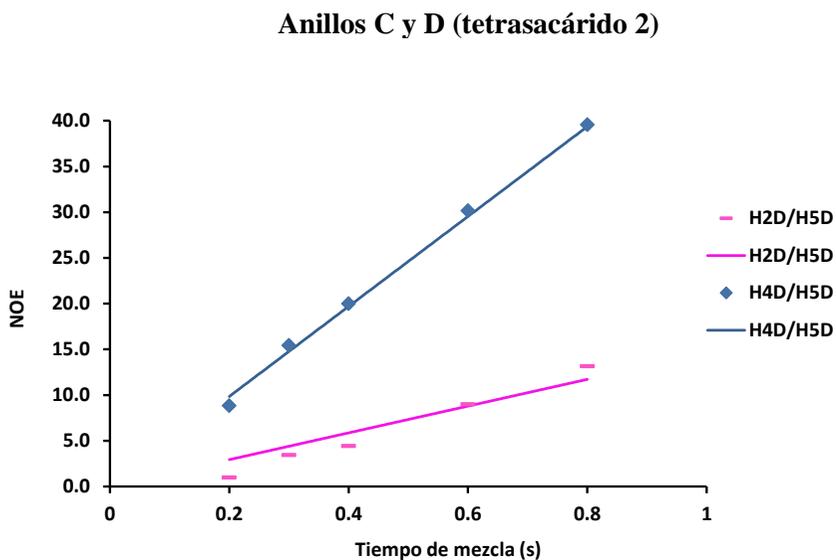
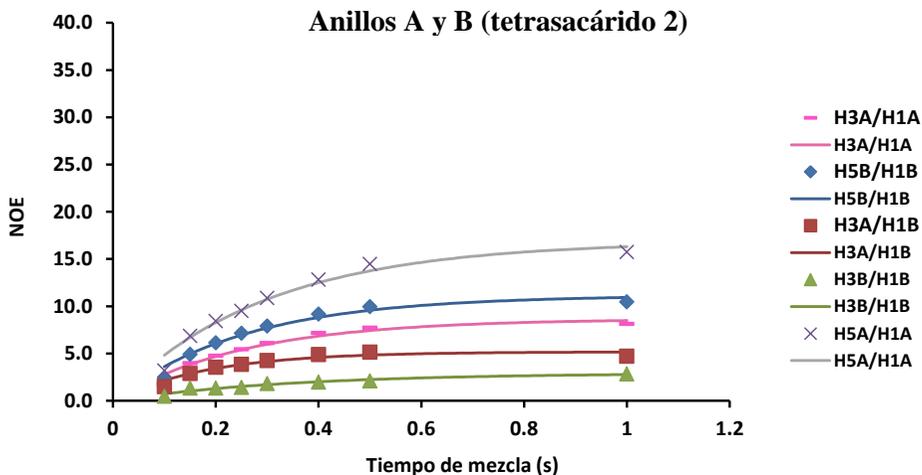
Espectro bidimensional TOCSY para el tetrasacárido **2** a 298K y 600 MHz.



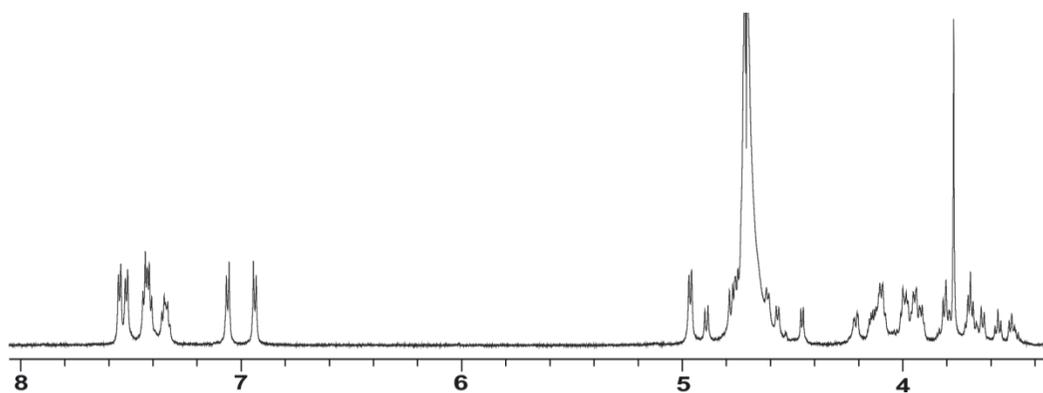
Espectro bidimensional HSQC para el tetrasacárido **2** a 298K y 600 MHz.



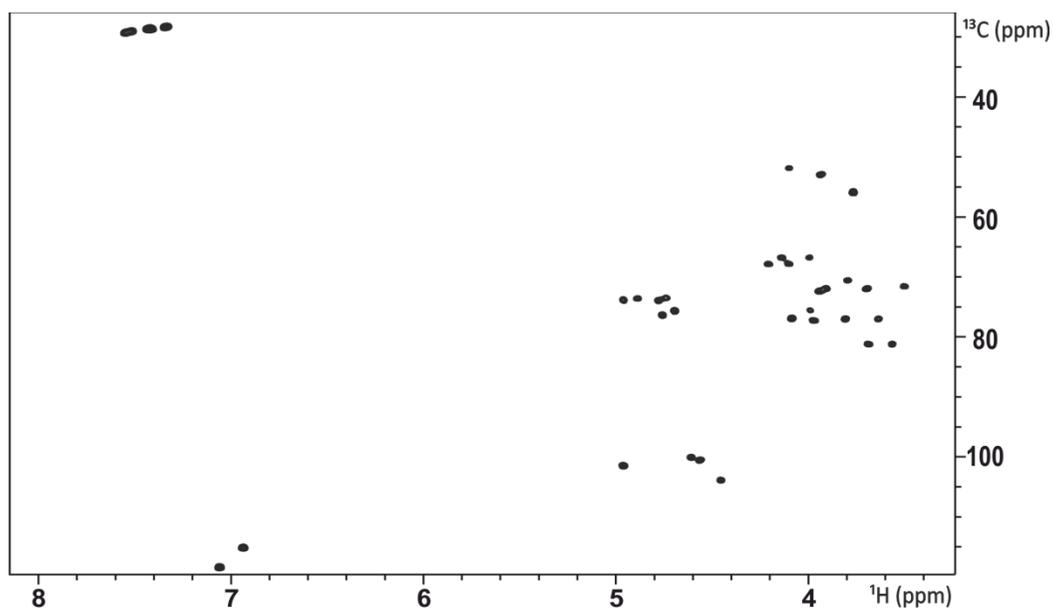
Espectro bidimensional NOESY para el tetrasacárido **2** a 298K, 600 MHz y 500 ms.



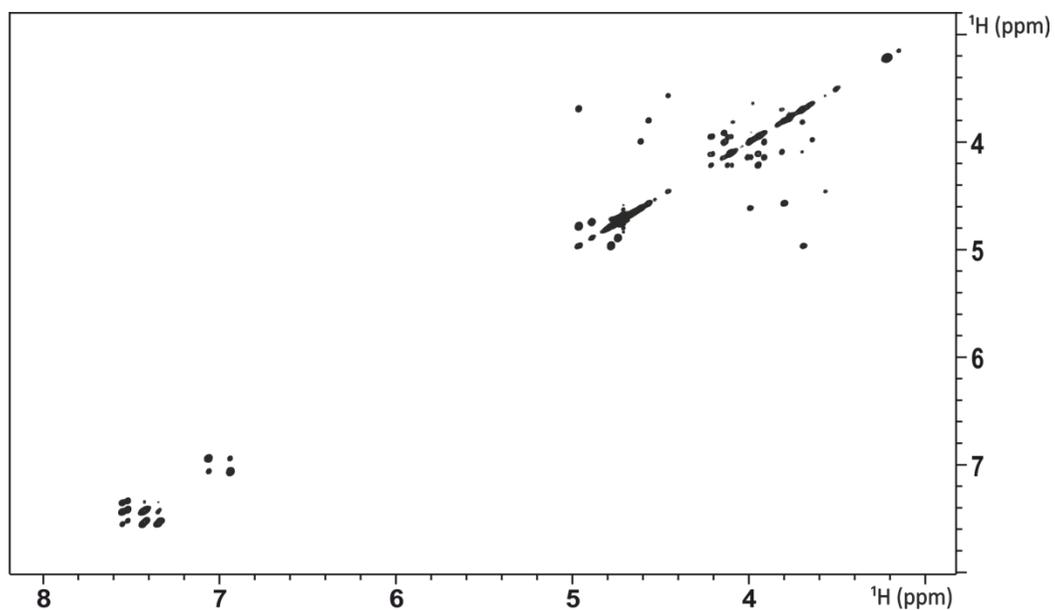
Curvas de crecimiento del NOE para los 4 anillos del tetrasacárido **2** a 298K y 600 MHz para el anillo D y a 281K y 600 MHz para los anillos A y B. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).



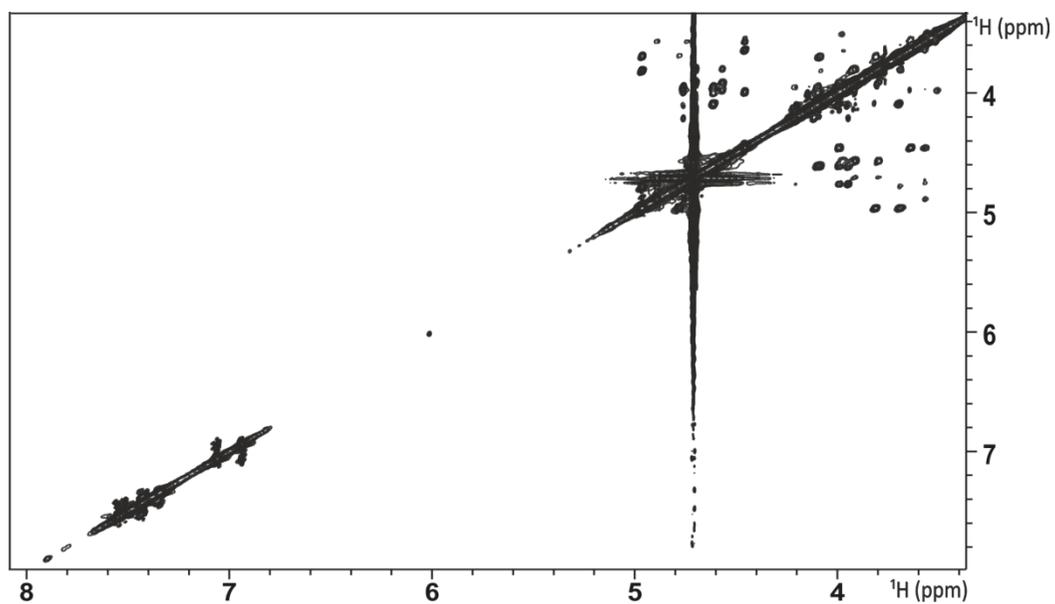
Espectro monodimensional para el tetrasacárido **5** a 298K y 700 MHz.



Espectro bidimensional HSQC para el tetrasacárido **5** a 298K y 700 MHz.

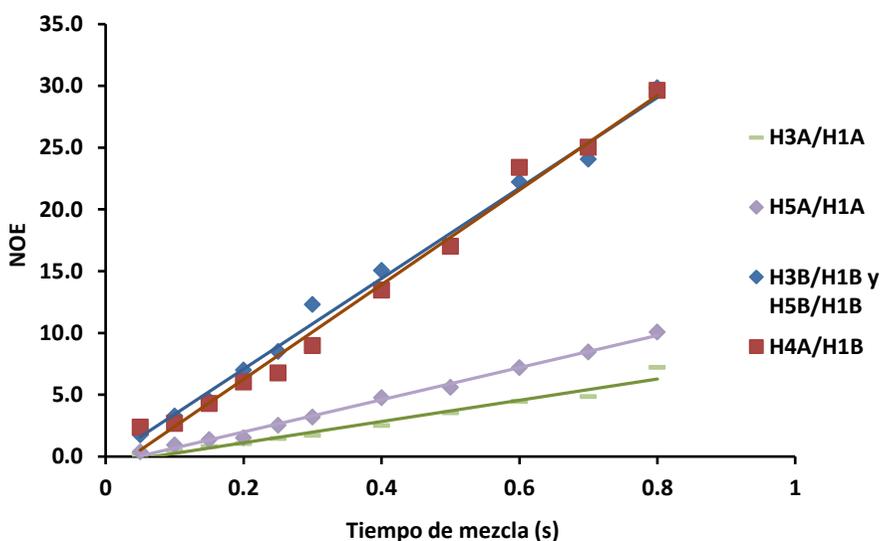


Espectro bidimensional TOCSY para el tetrasacárido **5** a 298K y 700 MHz.

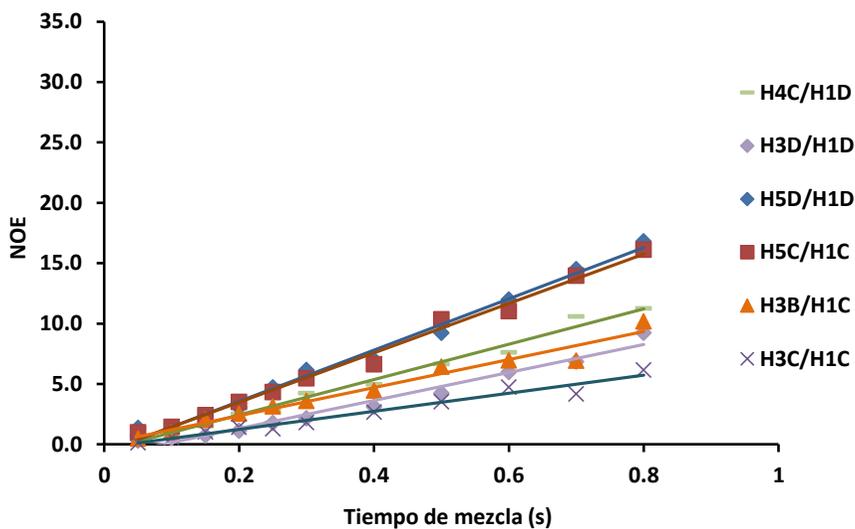


Espectro bidimensional NOESY para el tetrasacárido **5** a 298K, 700 MHz y 500 ms.

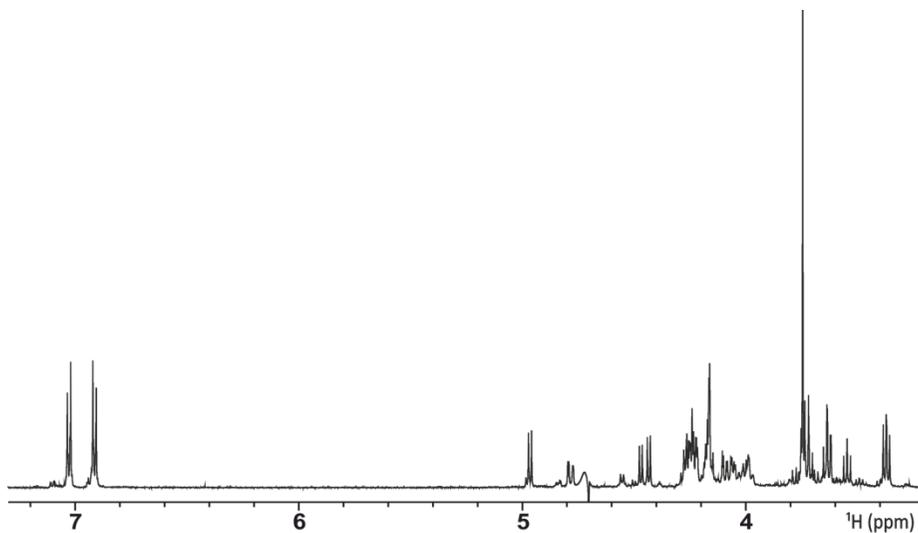
### Anillos A y B (tetrasacárido 5)



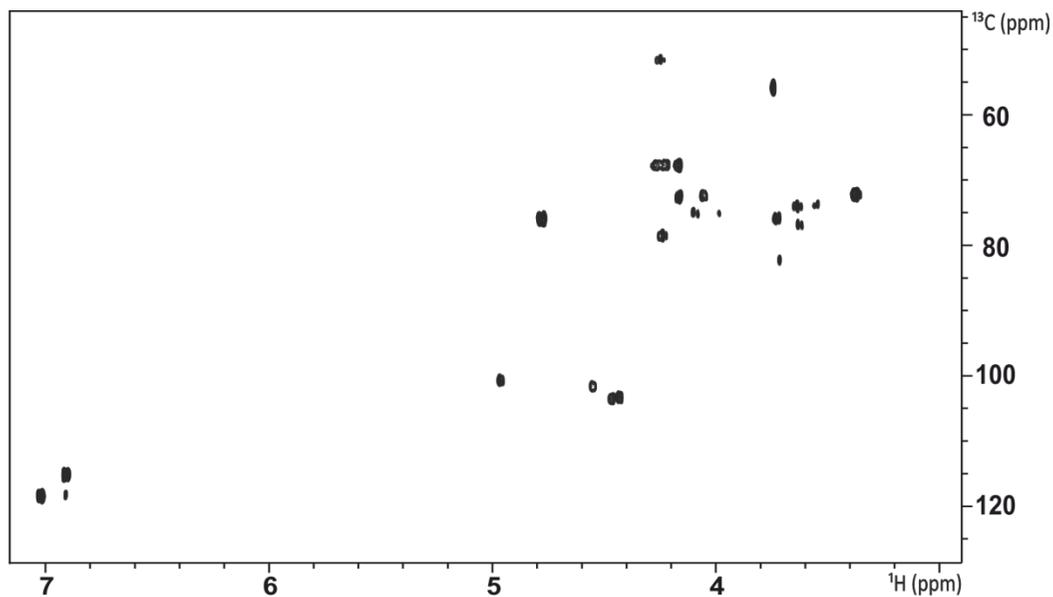
### Anillos C y D (tetrasacárido 5)



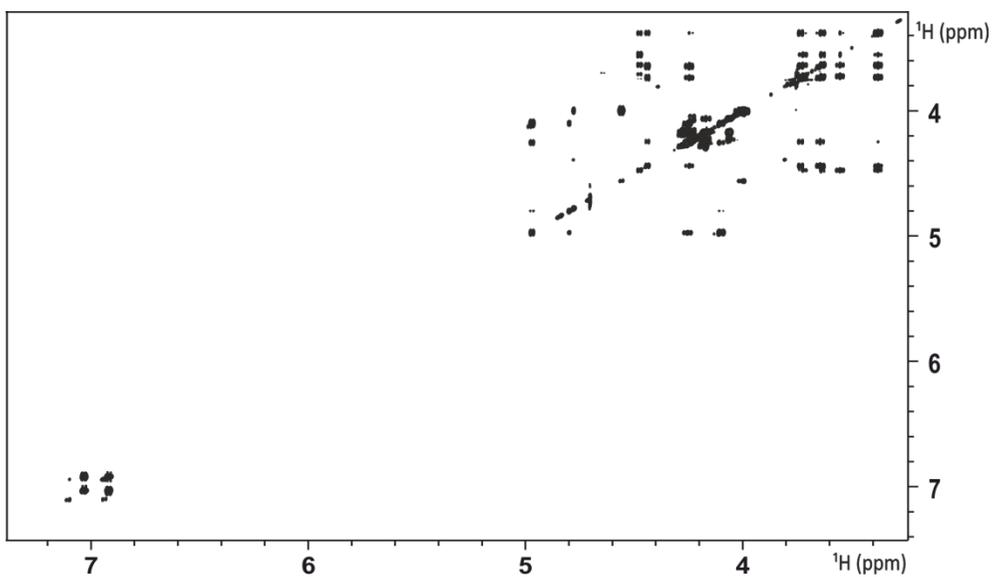
Curvas de crecimiento del NOE para los 4 anillos del tetrasacárido 5 a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).



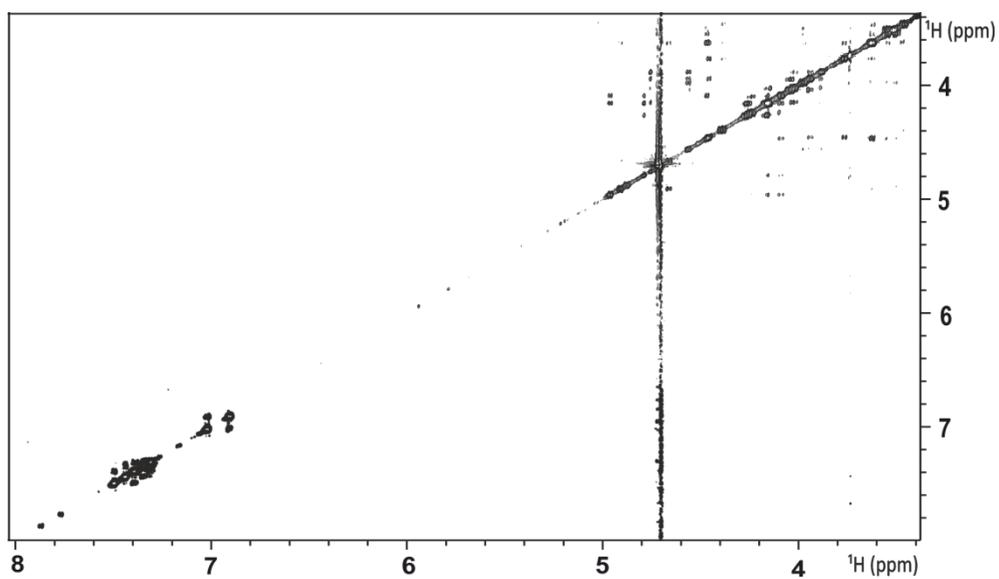
Espectro monodimensional para el tetrasacárido **7** a 298K y 600 MHz.



Espectro bidimensional HSQC para el tetrasacárido **7** a 298K y 700 MHz.

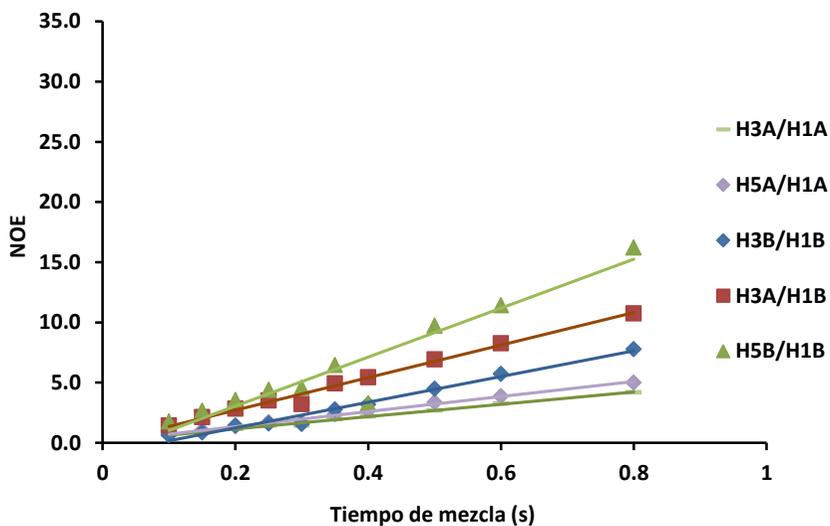


Espectro bidimensional TOCSY para el tetrasacárido **7** a 298K y 600 MHz.

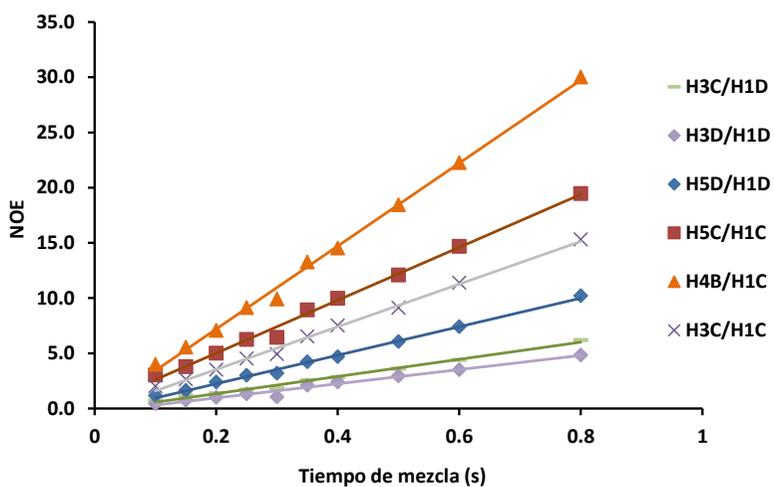


Espectro bidimensional NOESY para el tetrasacárido **7** a 298K, 600 MHz y 500 ms.

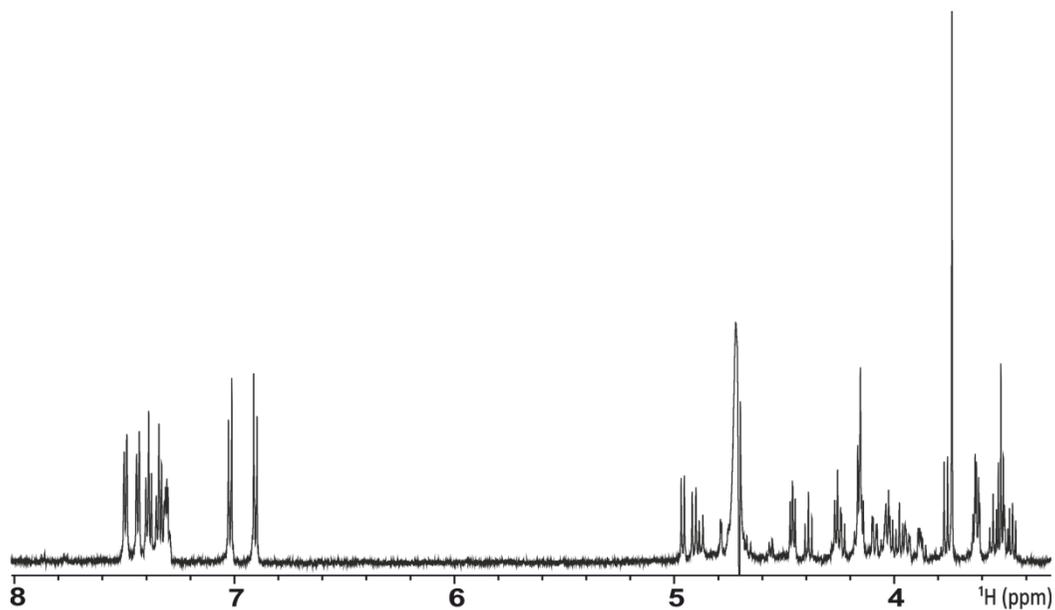
### Anillos A y B (tetrasacárido **7**)



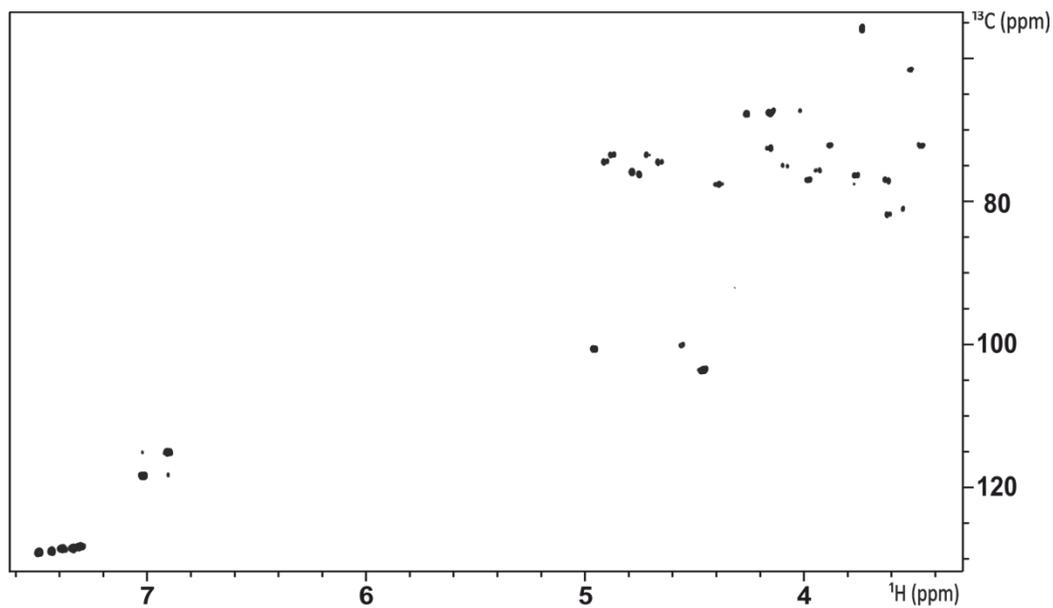
### Anillos C y D (tetrasacárido 7)



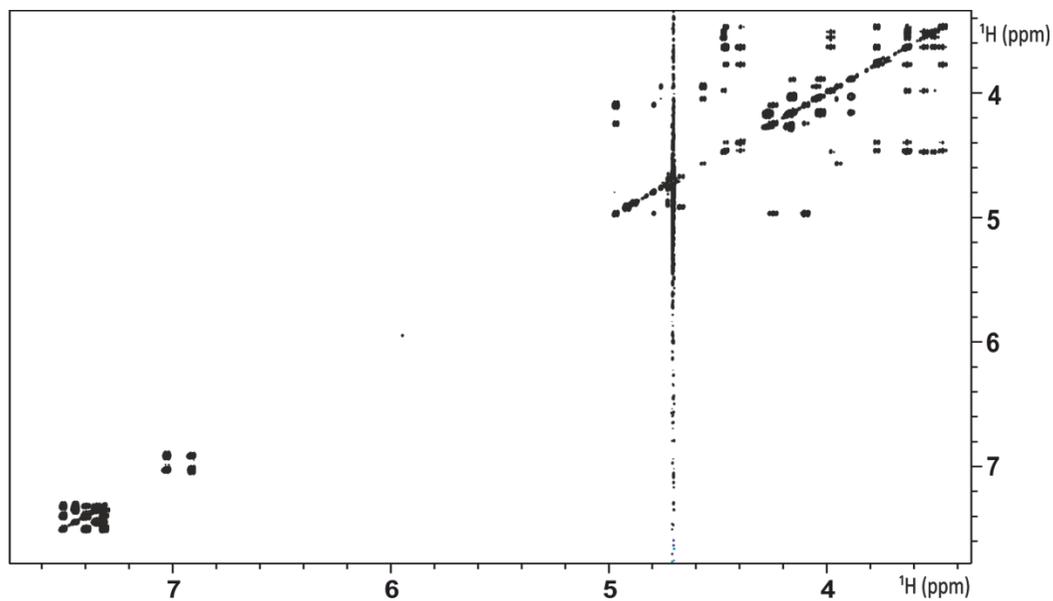
Curvas de crecimiento del NOE para los 4 anillos del tetrasacárido 7 a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).



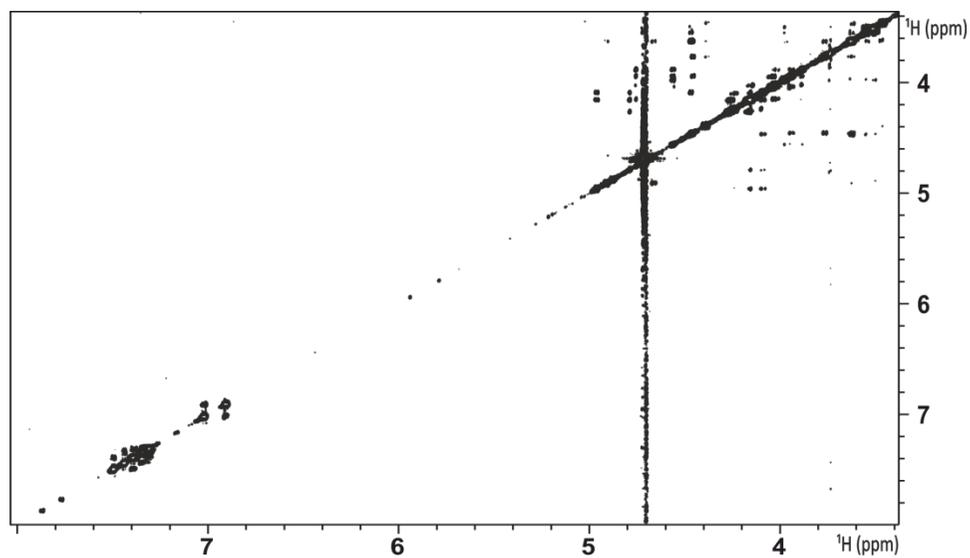
Espectro monodimensional para el tetrasacárido **8** a 298K y 600 MHz.



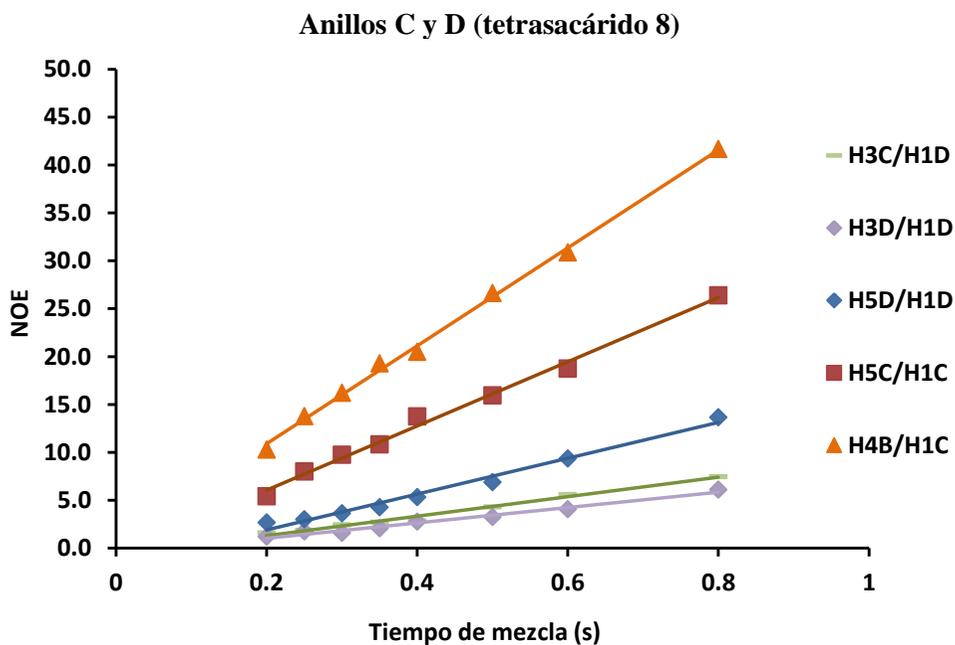
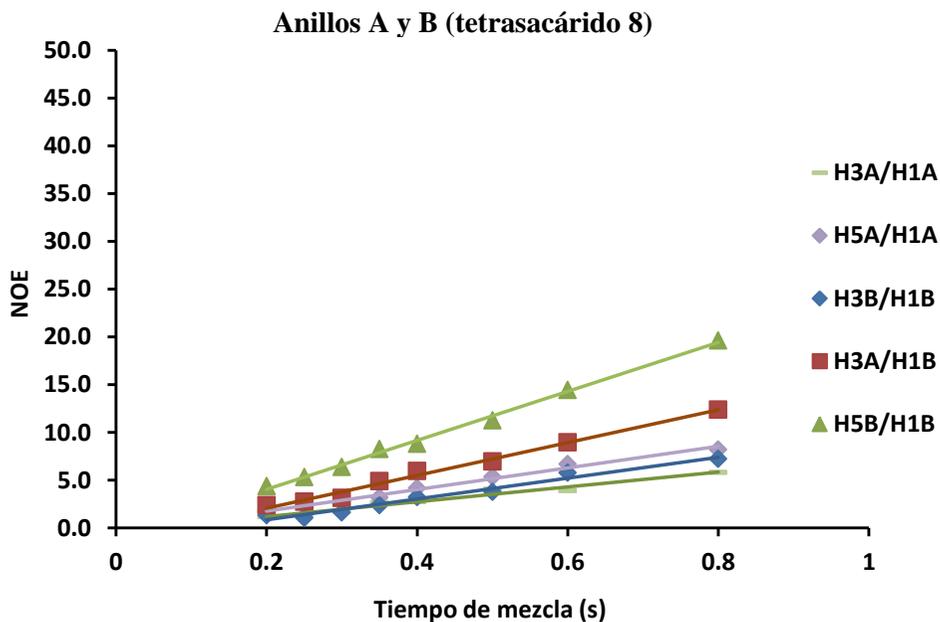
Espectro bidimensional HSQC para el tetrasacárido **8** a 298K y 600 MHz.



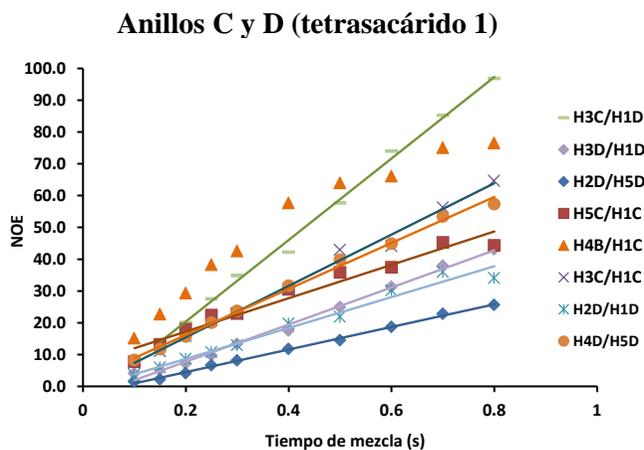
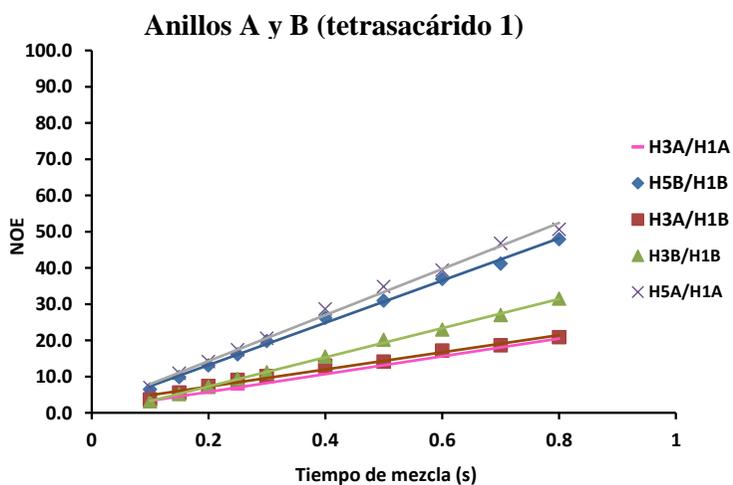
Espectro bidimensional TOCSY para el tetrasacárido **8** a 298K y 600 MHz.



Espectro bidimensional NOESY para el tetrasacárido **8** a 298K, 600 MHz y 500 ms.

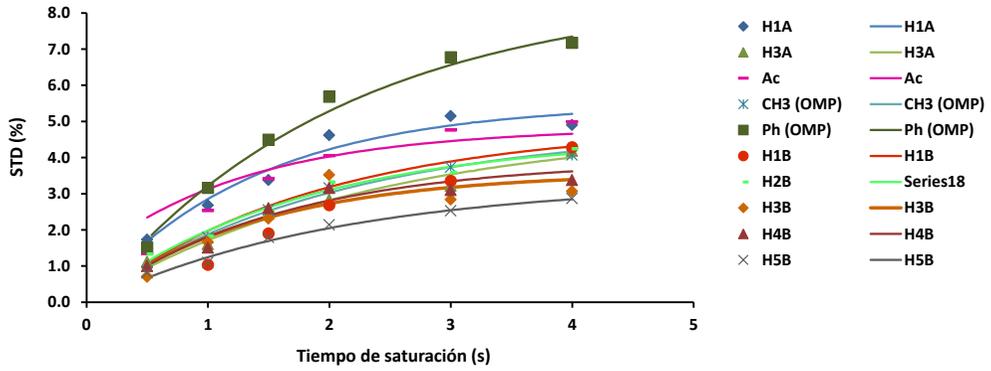


Curvas de crecimiento del NOE para los 4 anillos del tetrasacárido **8** a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).

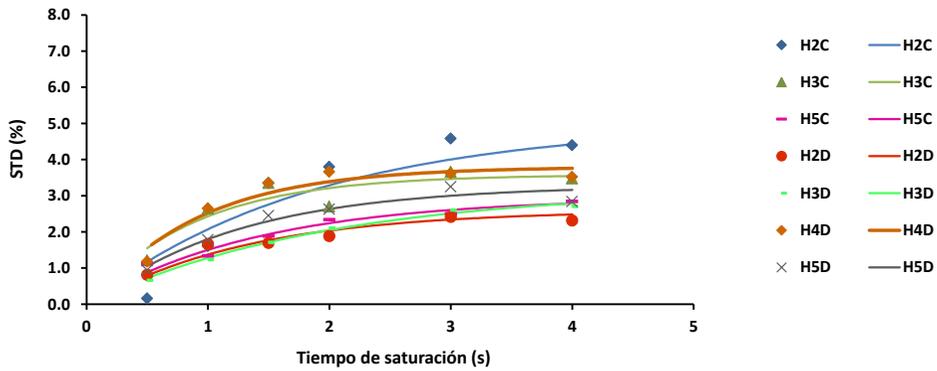


Curvas de crecimiento del NOE transferido para los 4 anillos del tetrasacárido 1 a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).

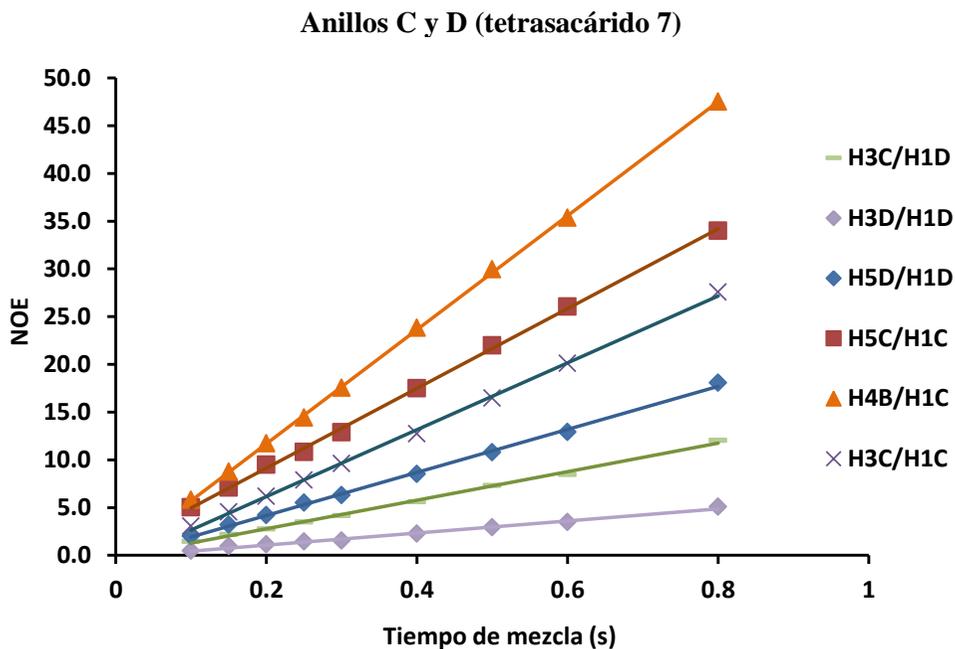
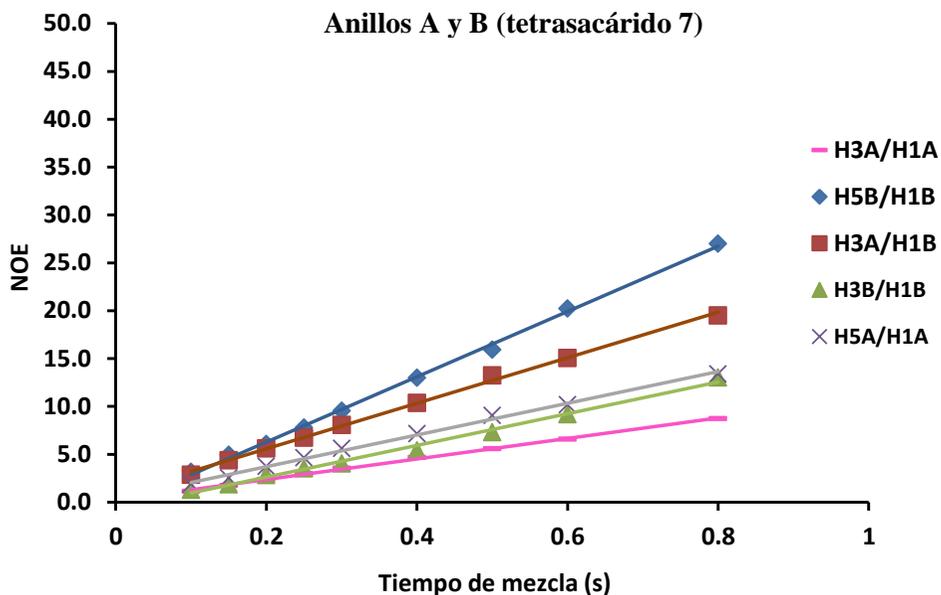
### Anillos A y B (tetrasacárido 1)



### Anillos C y D (tetrasacárido 1)

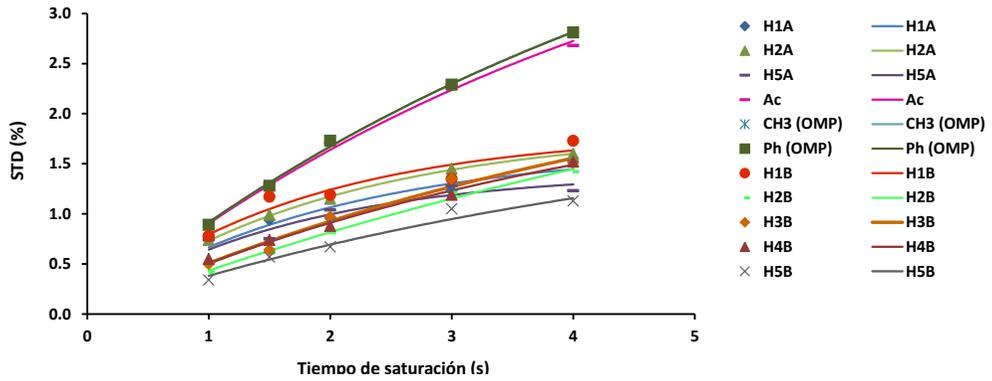


Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el tetrasacárido 1.

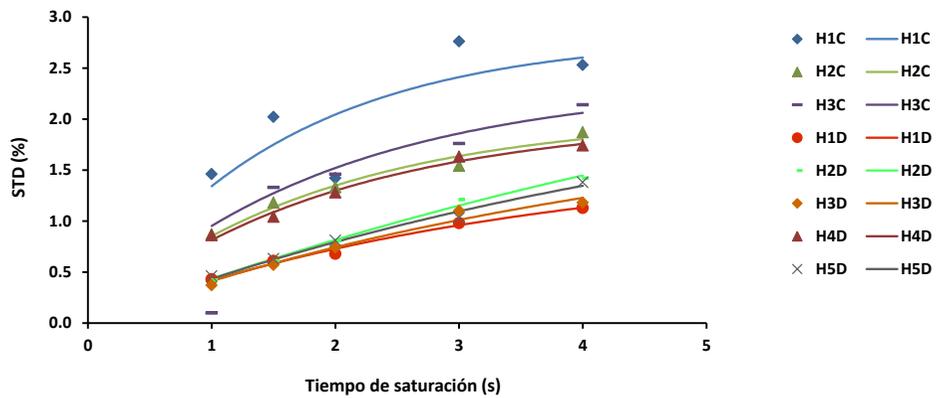


Curvas de crecimiento del NOE transferido para los 4 anillos del tetrasacárido 7 a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).

### Anillos A y B (tetrasacárido 7)

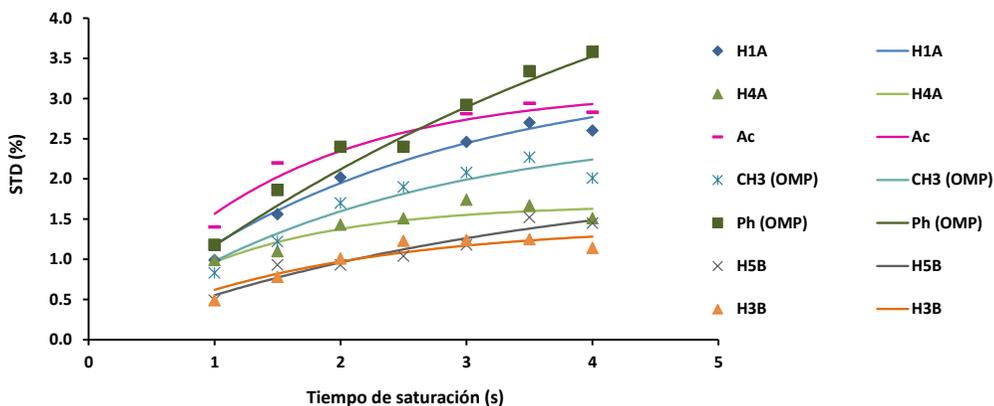


### Anillos C y D (tetrasacárido 7)

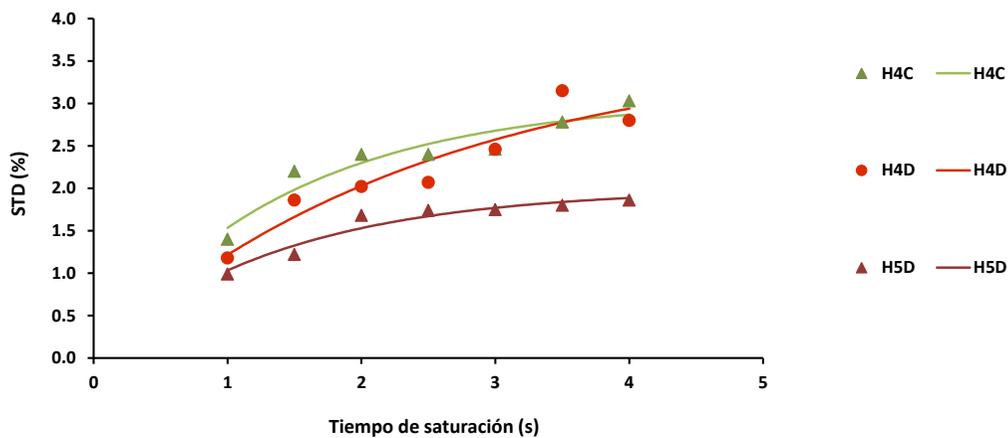


Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el tetrasacárido 7.

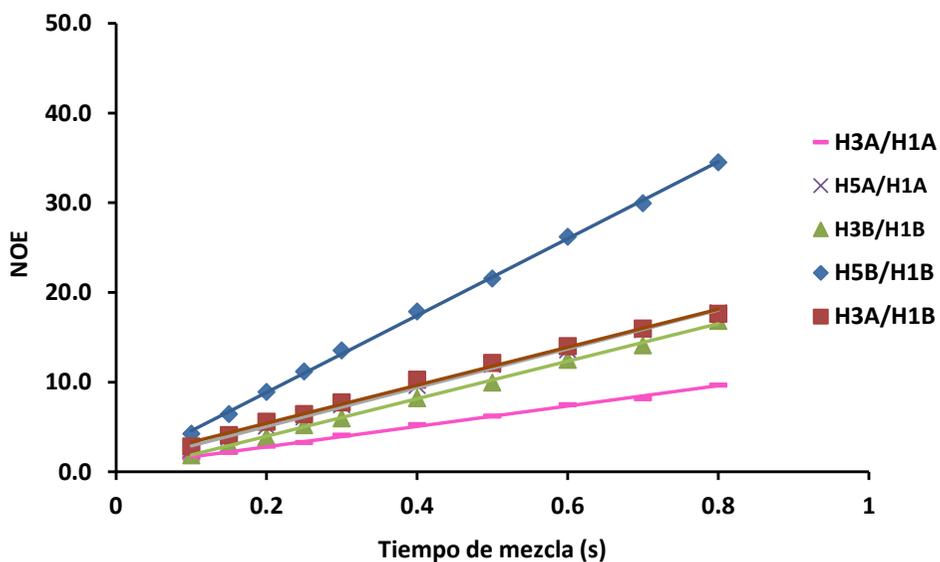
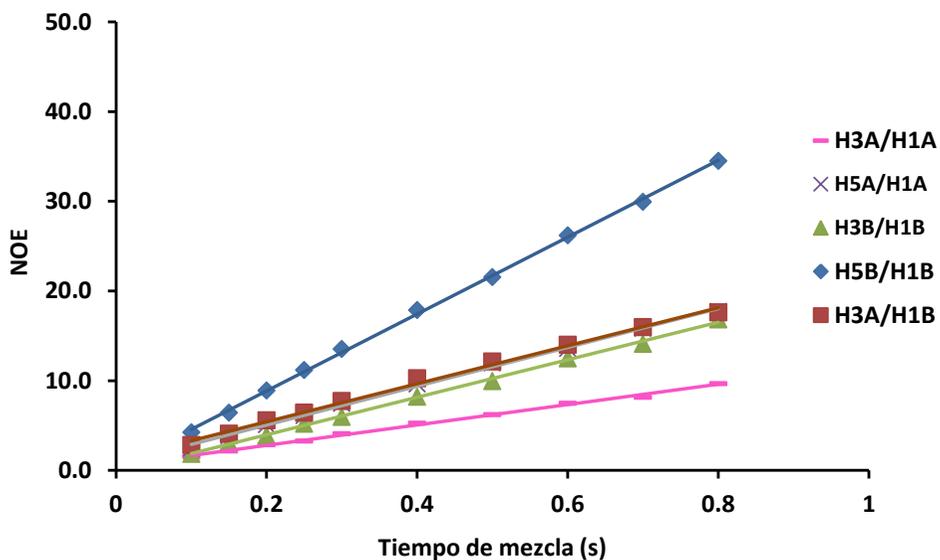
### Anillos A y C (tetrasacárido 10)



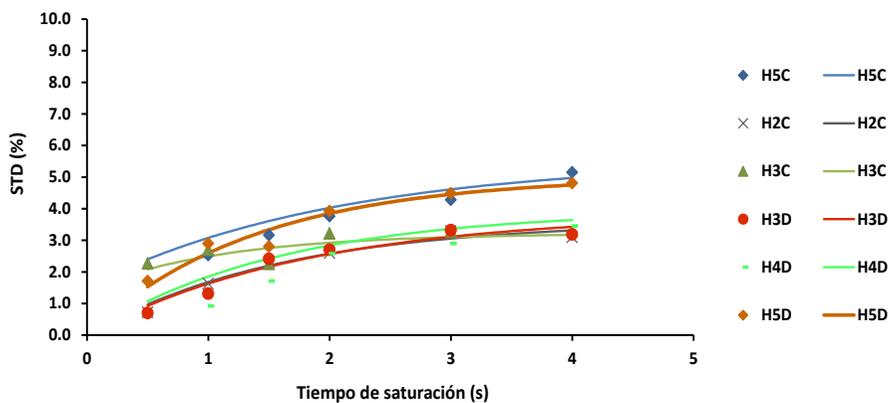
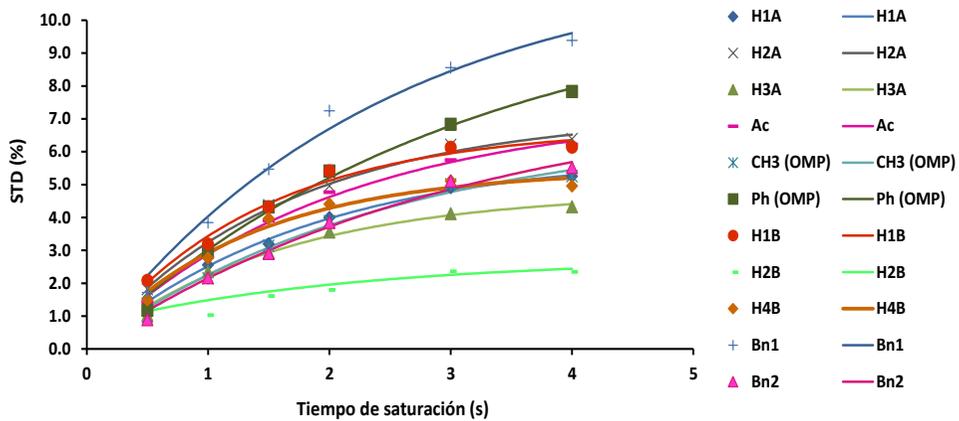
### Anillos C y D (tetrasacárido 10)



Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el tetrasacárido **10**.

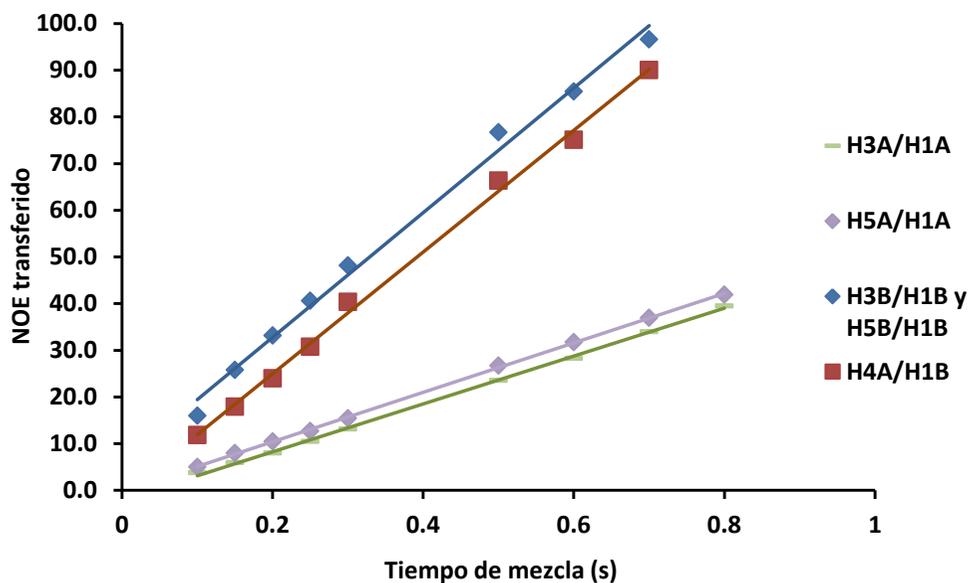


Curvas de crecimiento del NOE transferido para los 4 anillos del tetrasacárido **2** a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).

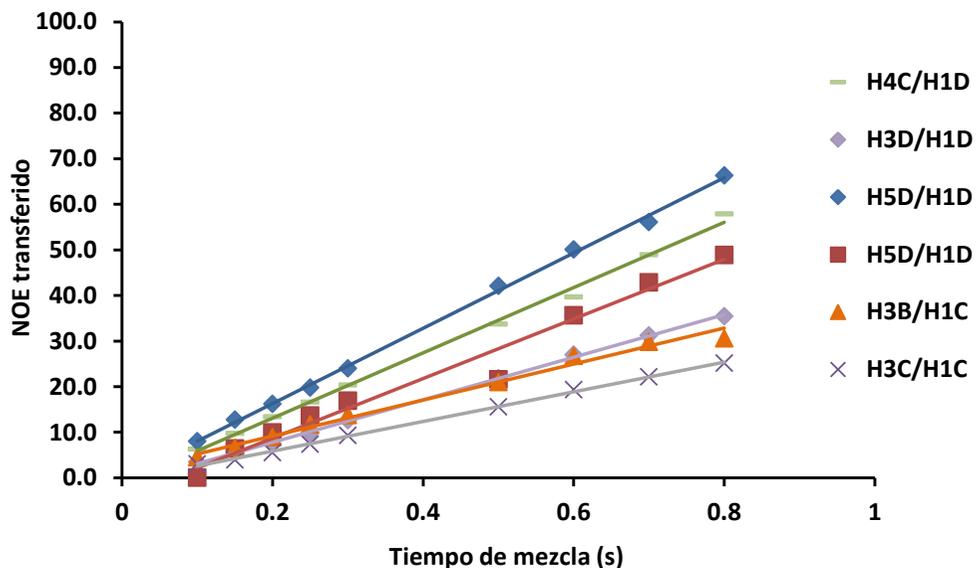


Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el tetrasacárido 2.

### Anillos A y B (tetrasacárido 5)

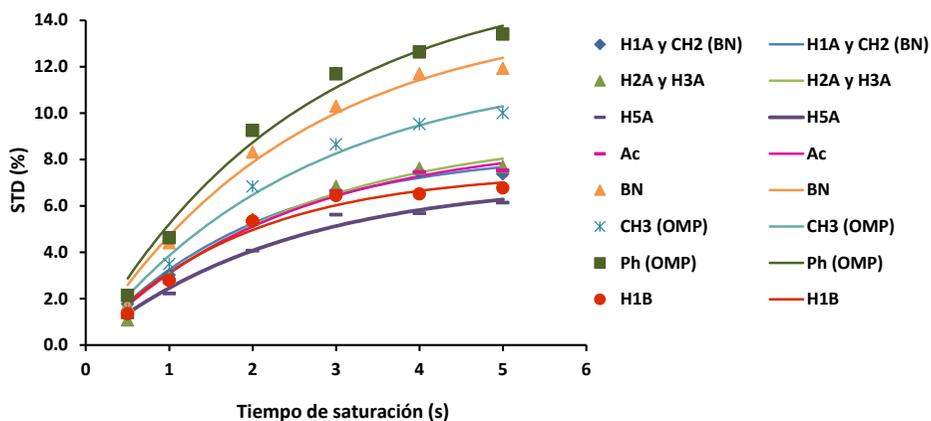


#### Anillos C y D (tetrasacárido 5)

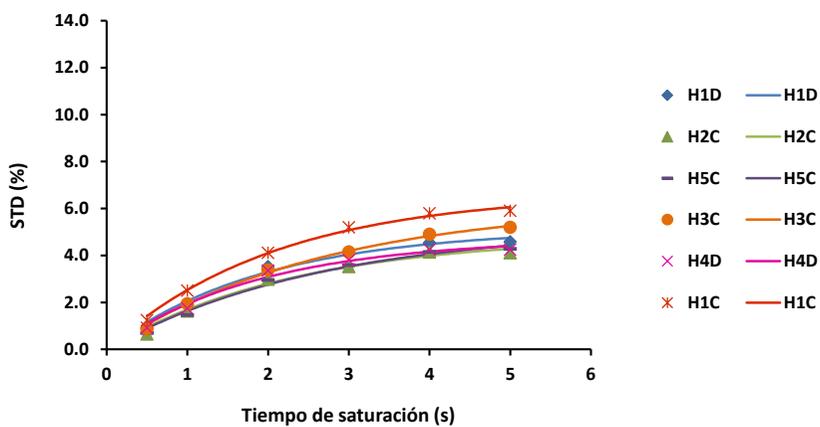


Curvas de crecimiento del NOE transferido para los 4 anillos del tetrasacárido **5** a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).

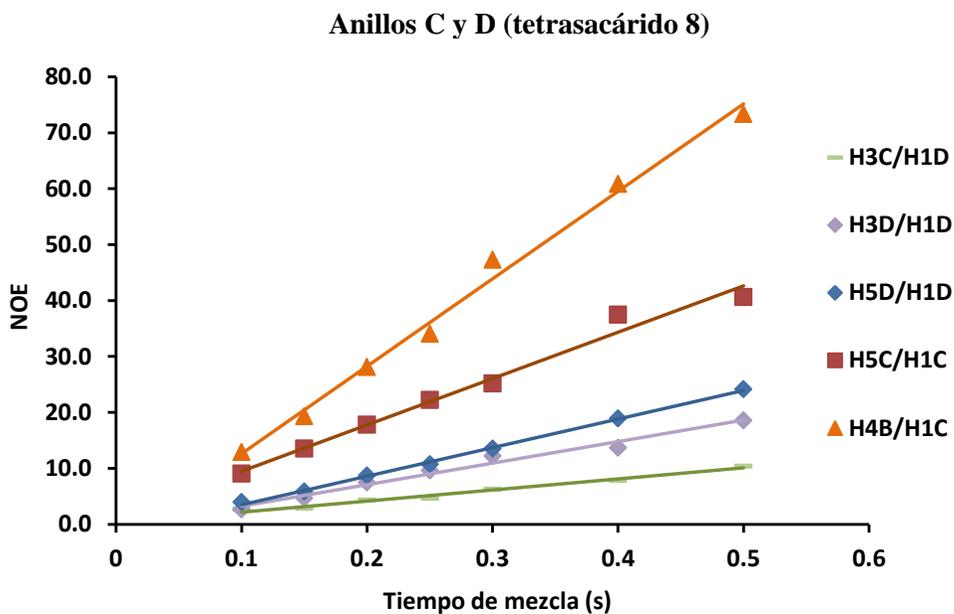
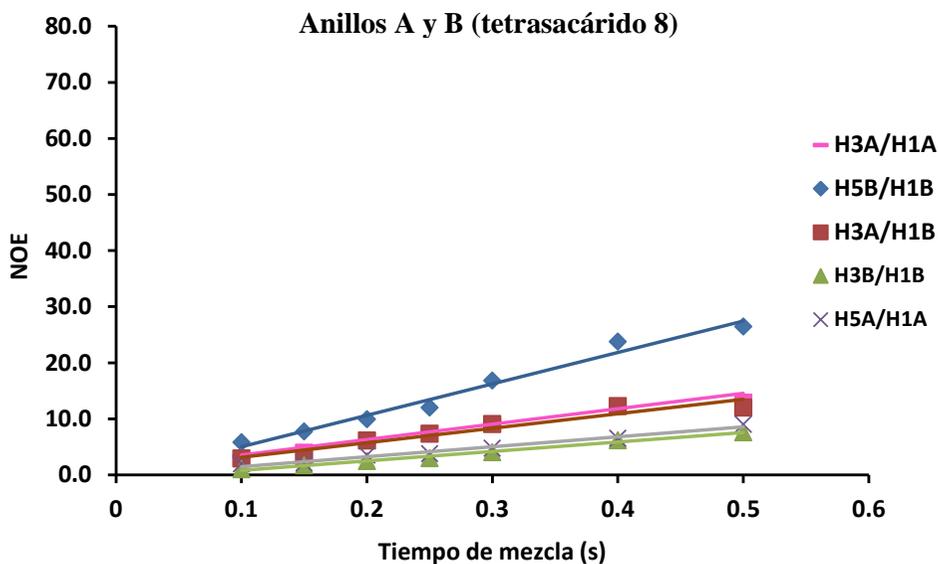
#### Anillos A y B (tetrasacárido 5)



### Anillos C y D (tetrasacárido 5)

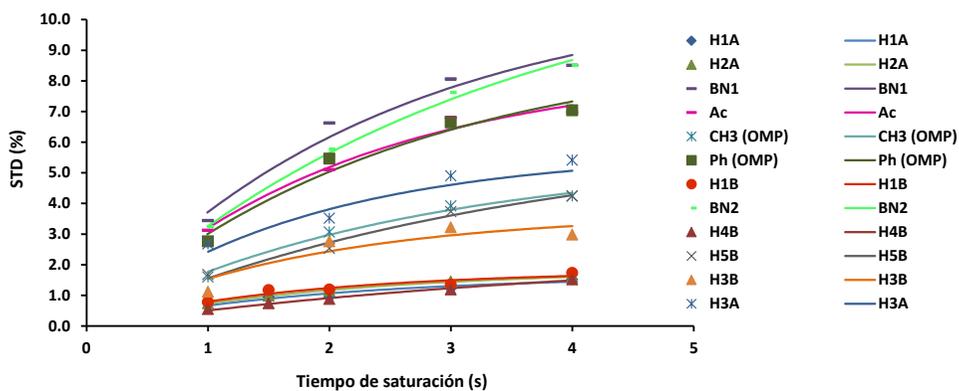


Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el tetrasacárido 5.

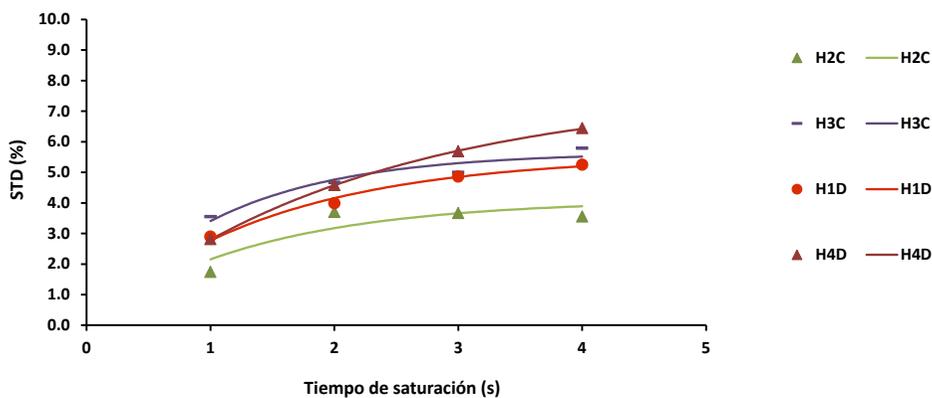


Curvas de crecimiento del NOE transferido para los 4 anillos del tetrasacárido **8** a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).

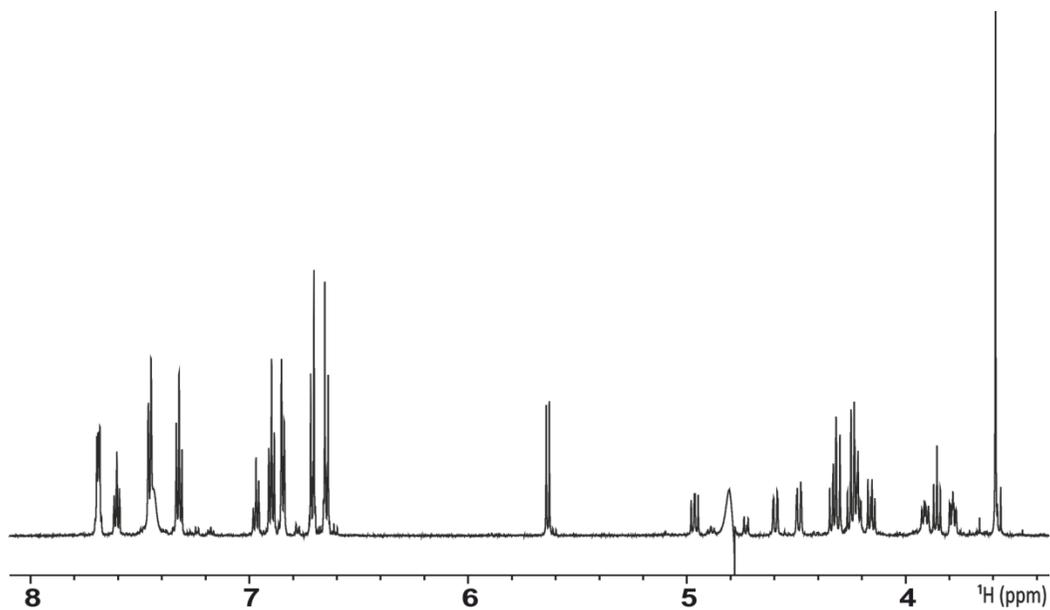
Anillos C y D (tetrasacárido 8)



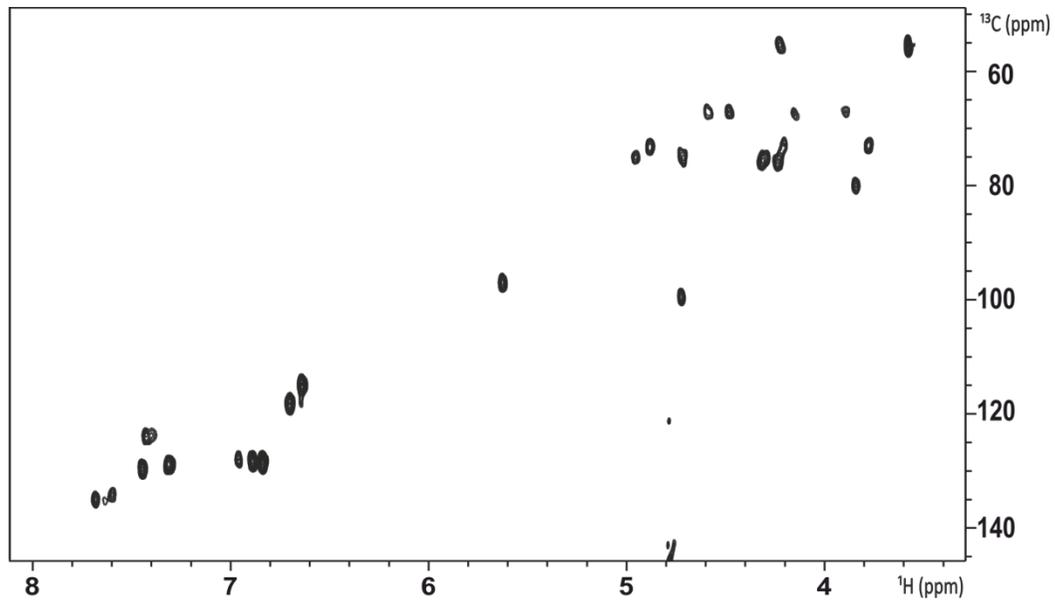
### Anillos C y D (tetrasacárido 8)



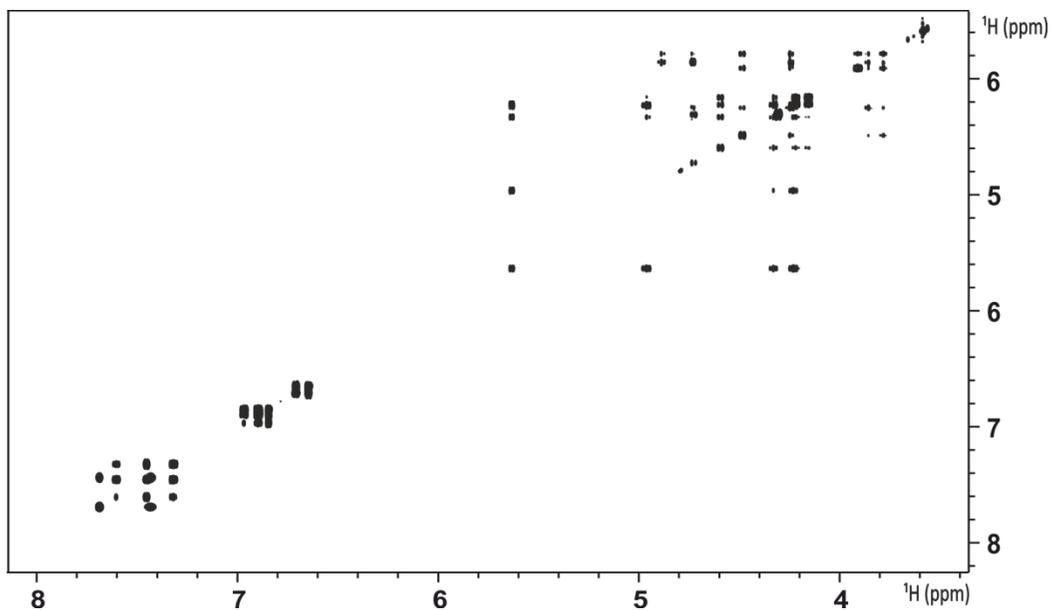
Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el tetrasacárido 8.



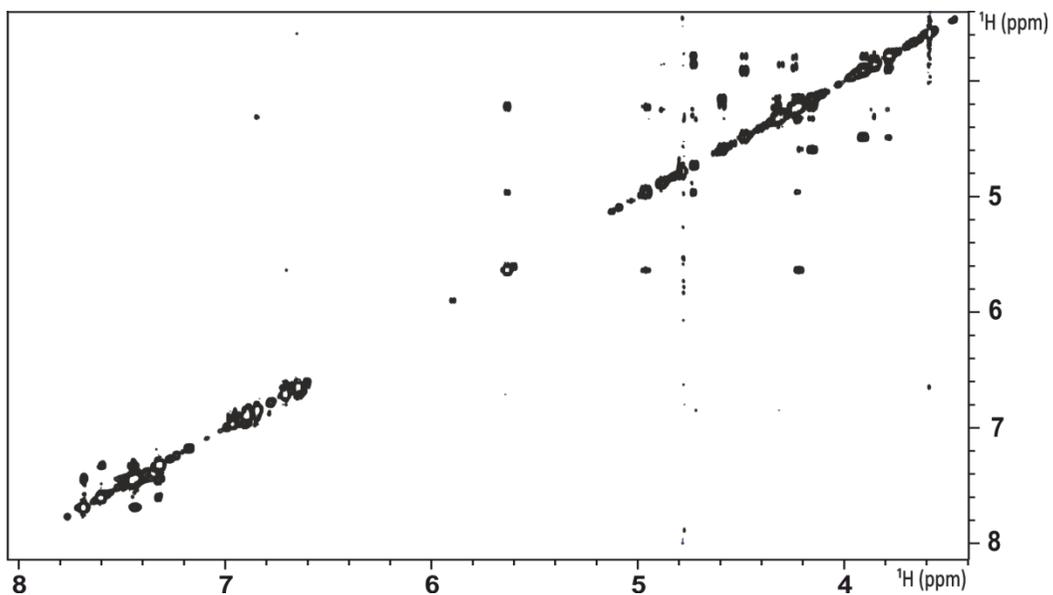
Espectro monodimensional para el disacárido **11** a 290K y 600 MHz.



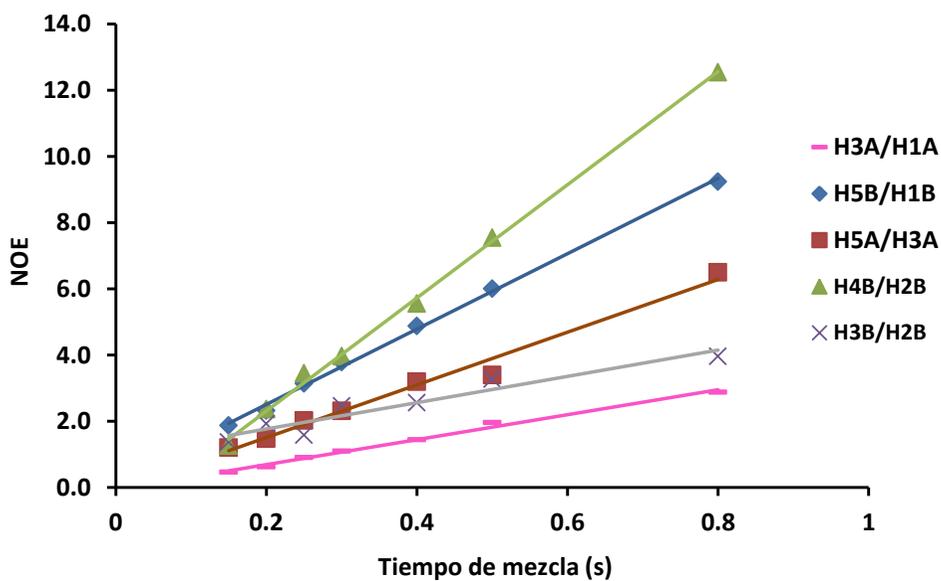
Espectro bidimensional HSQC para el disacárido **11** a 290K y 600 MHz.



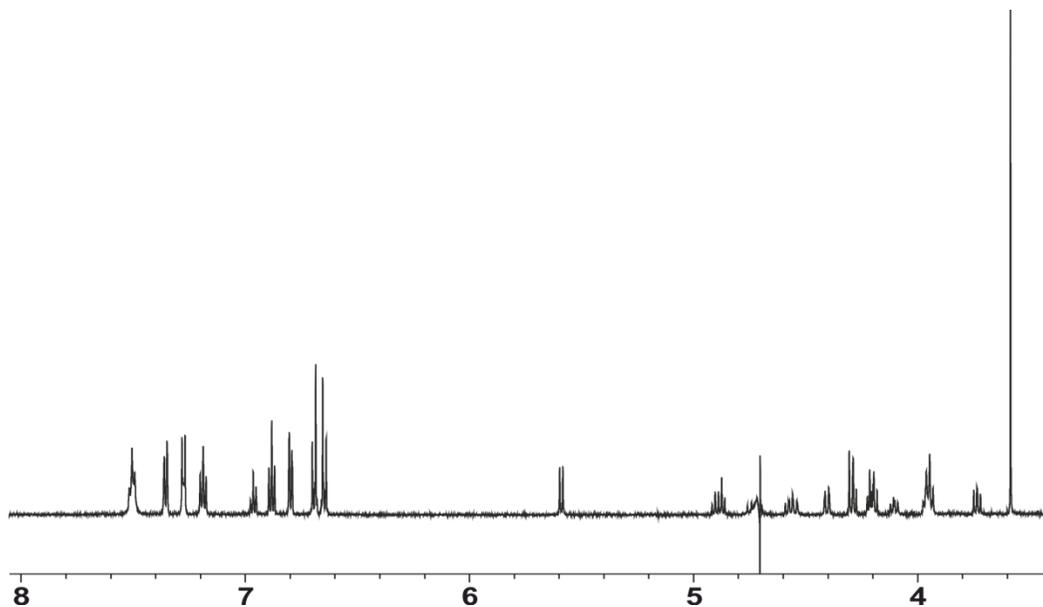
Espectro bidimensional TOCSY para el disacárido **11** a 290K y 600 MHz.



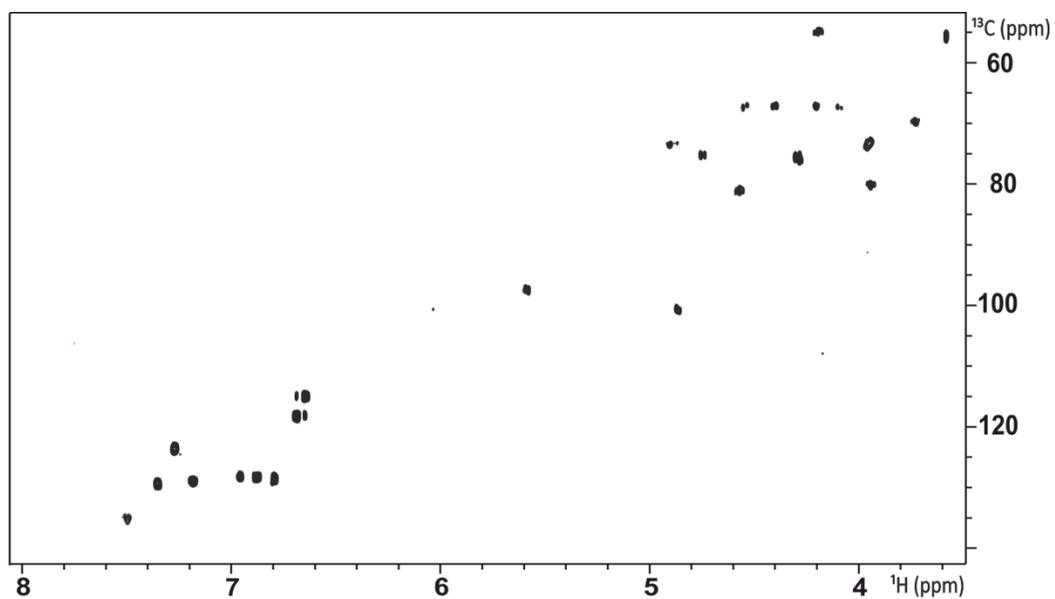
Espectro bidimensional NOESY para el disacárido **11** a 290K y 600 MHz.



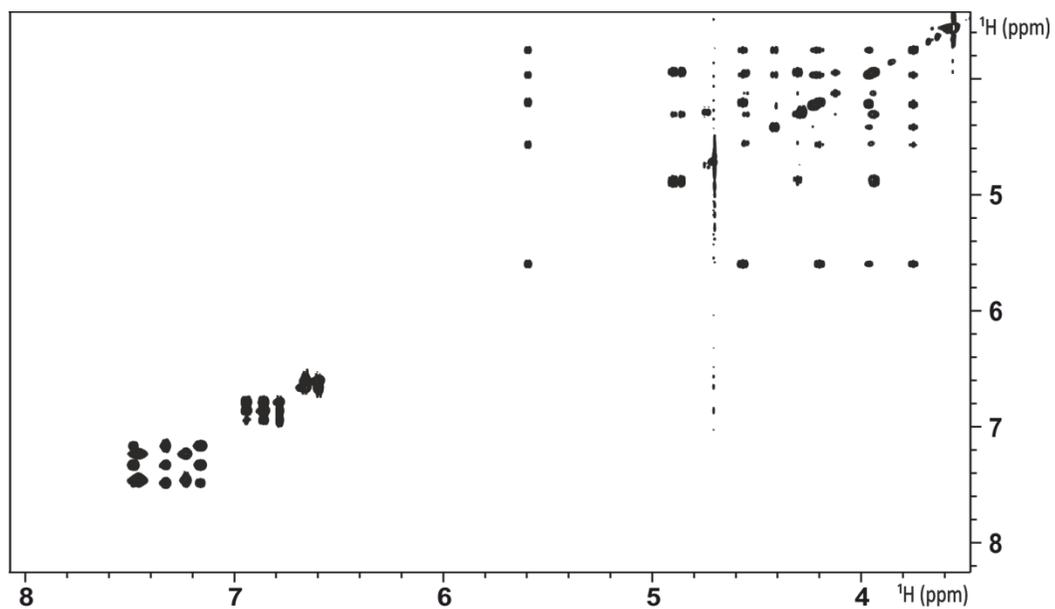
Curvas de crecimiento del NOE para los 2 anillos del disacárido **11** a 290K y 600 MHz.  
Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).



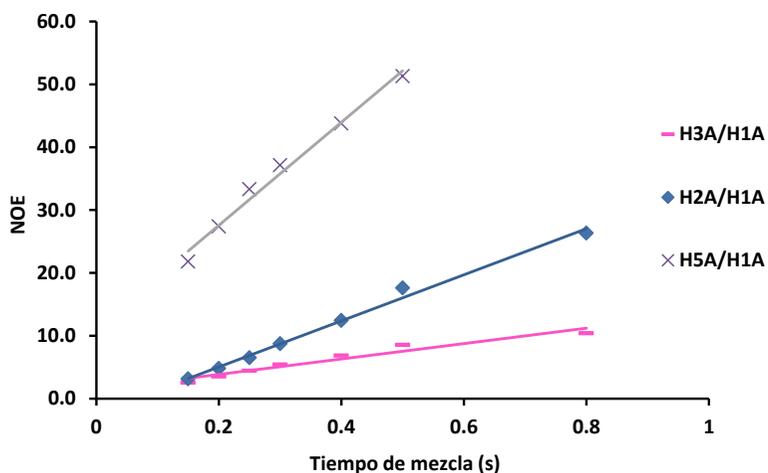
Espectro monodimensional para el disacárido **12** a 298K y 600 MHz.



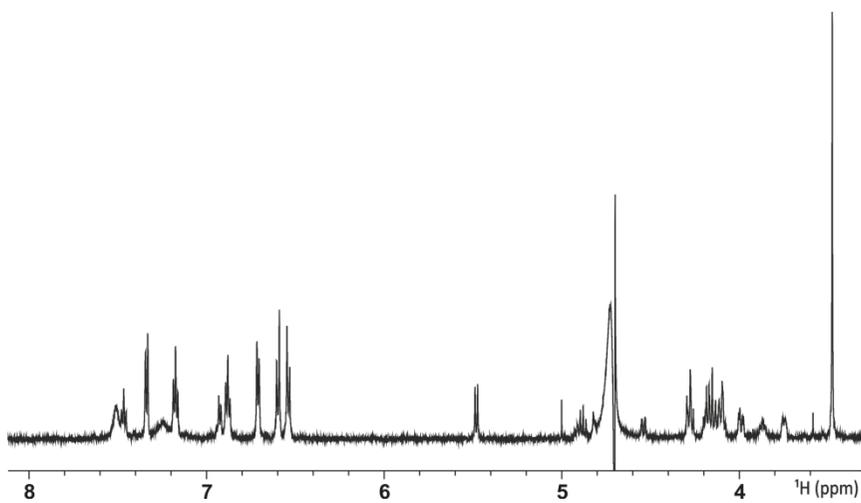
Espectro bidimensional HSQC para el disacárido **12** a 298K y 600 MHz.



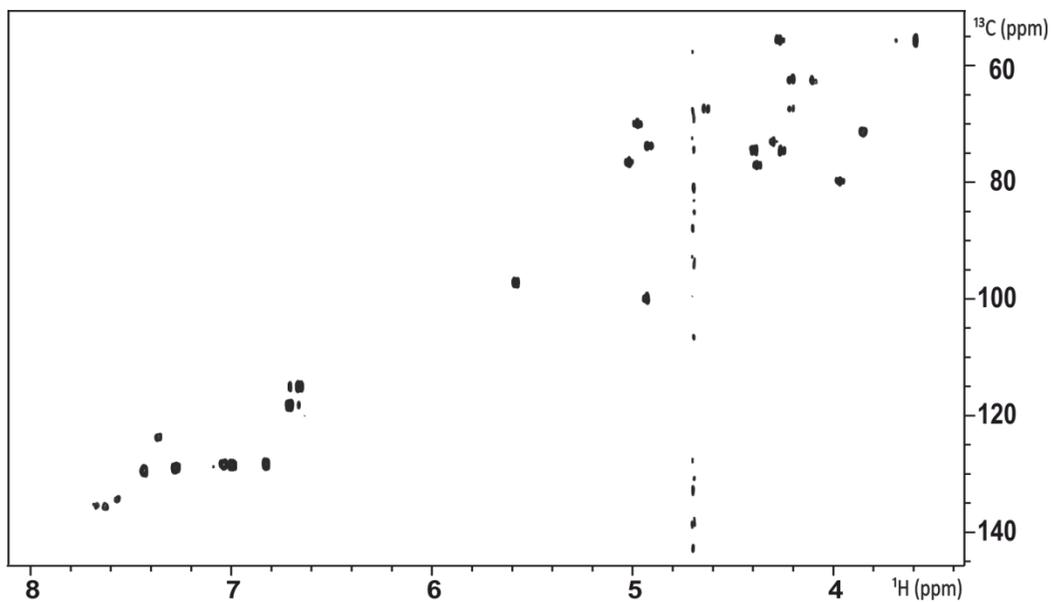
Espectro bidimensional TOCSY para el disacárido **12** a 298K y 600 MHz.



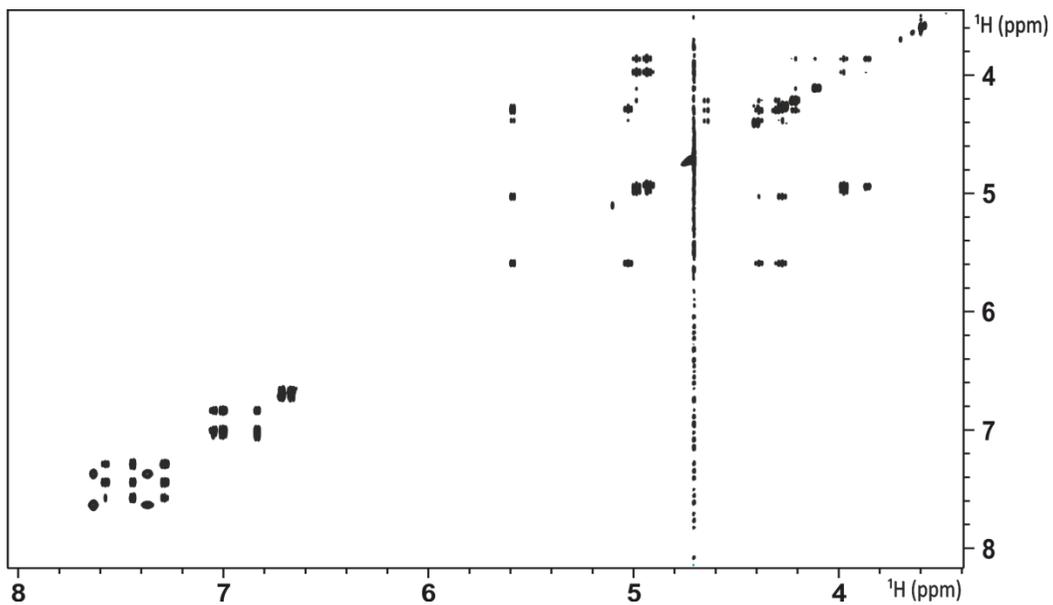
Curvas de crecimiento del NOE para los 2 anillos del disacárido **12** a 298K y 600 MHz.  
Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).



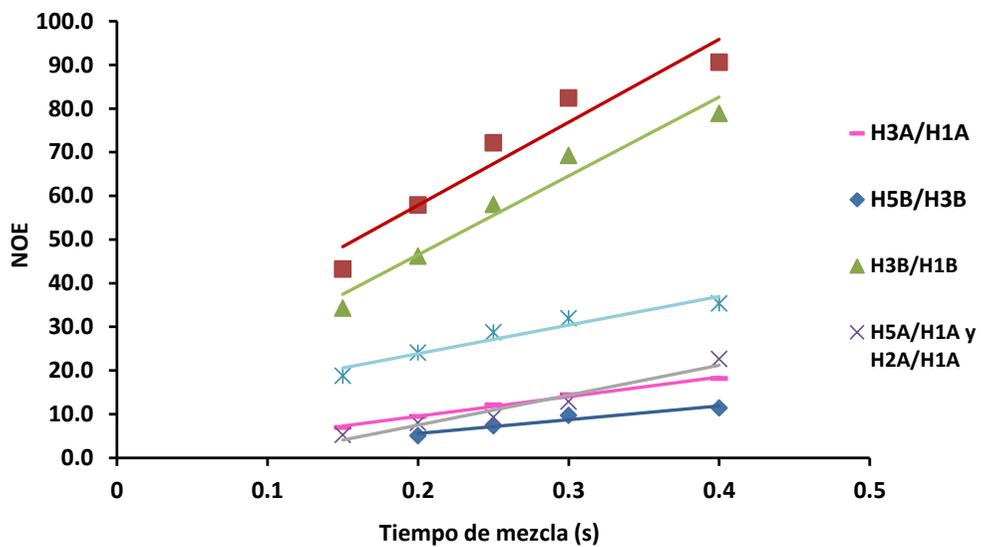
Espectro monodimensional para el disacárido **13** a 298K y 600 MHz.



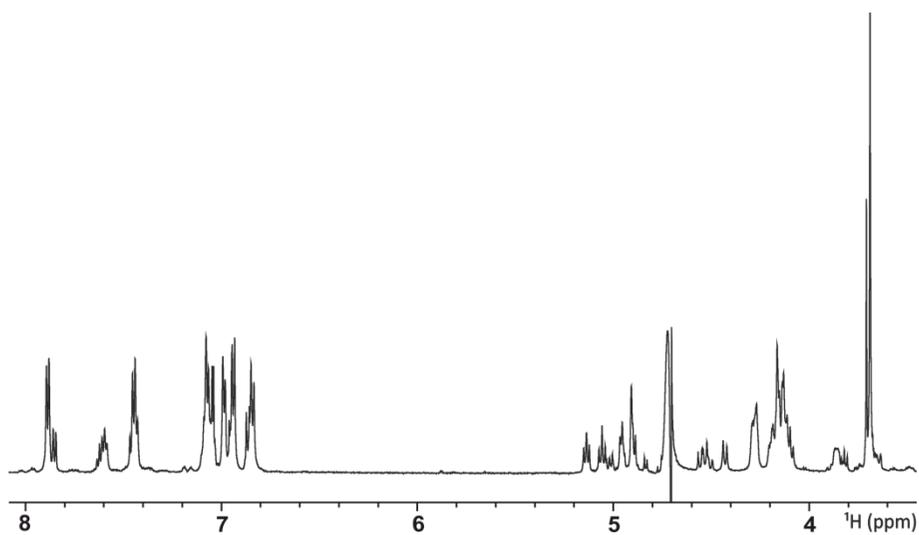
Espectro bidimensional HSQC para el disacárido **13** a 298K y 600 MHz.



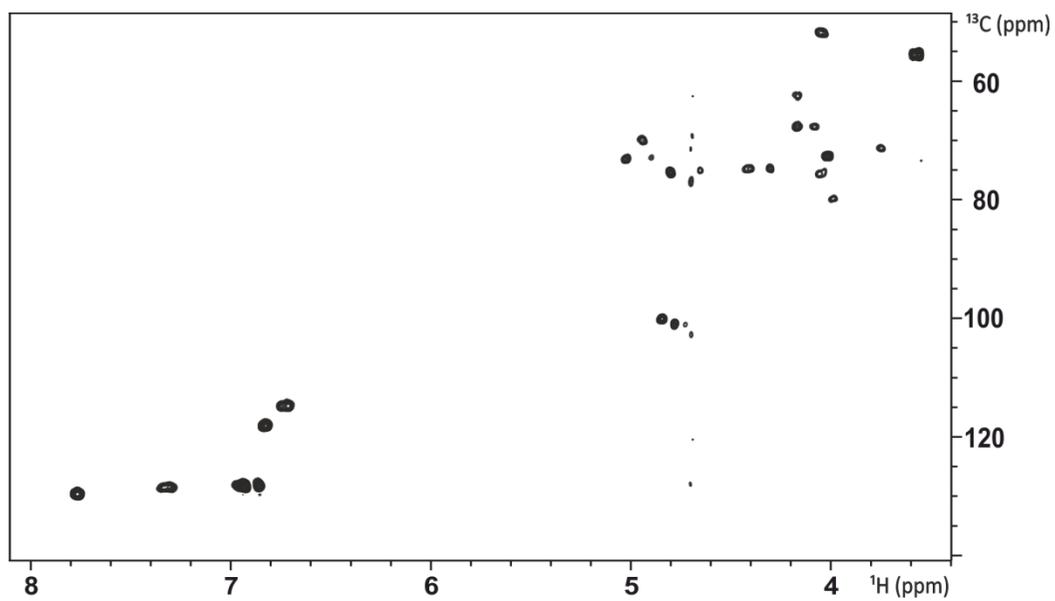
Espectro bidimensional TOCSY para el disacárido **13** a 298K y 600 MHz.



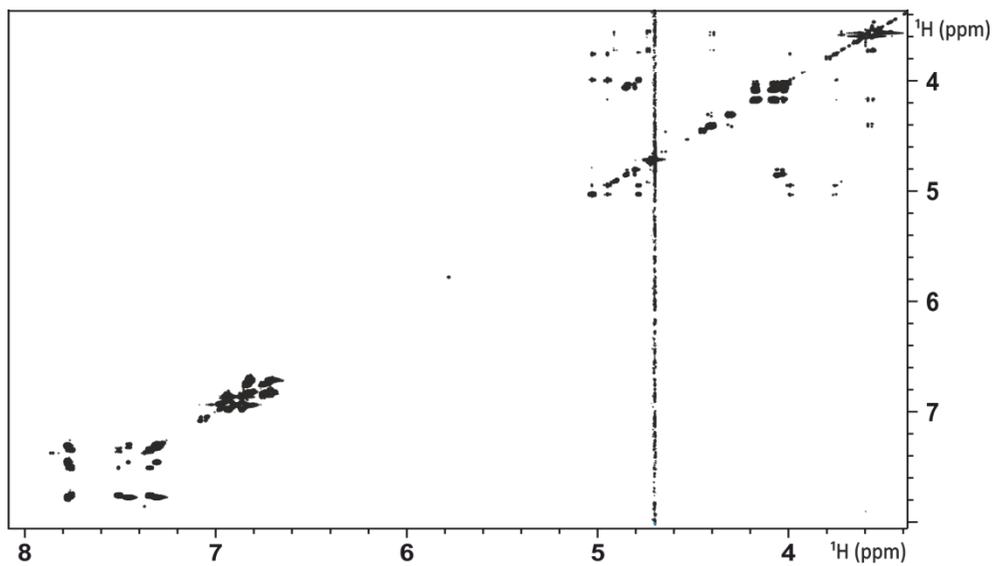
Curvas de crecimiento del NOE para los 2 anillos del disacárido **13** a 298K y 600 MHz.  
Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).



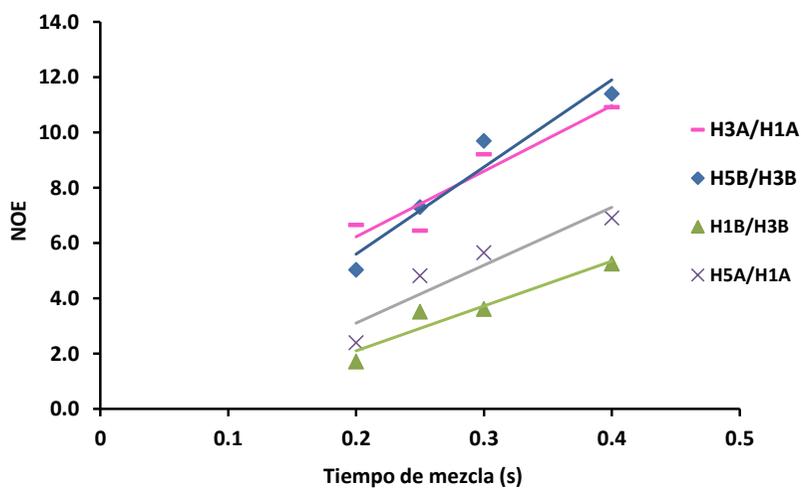
Espectro monodimensional para el disacárido **15** a 298K y 600 MHz.



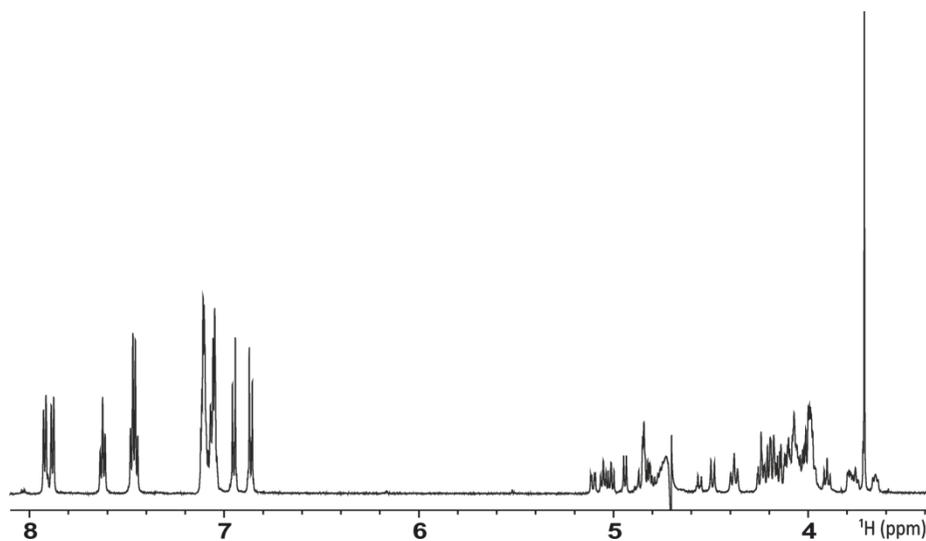
Espectro bidimensional HSQC para el disacárido **15** a 298K y 600 MHz.



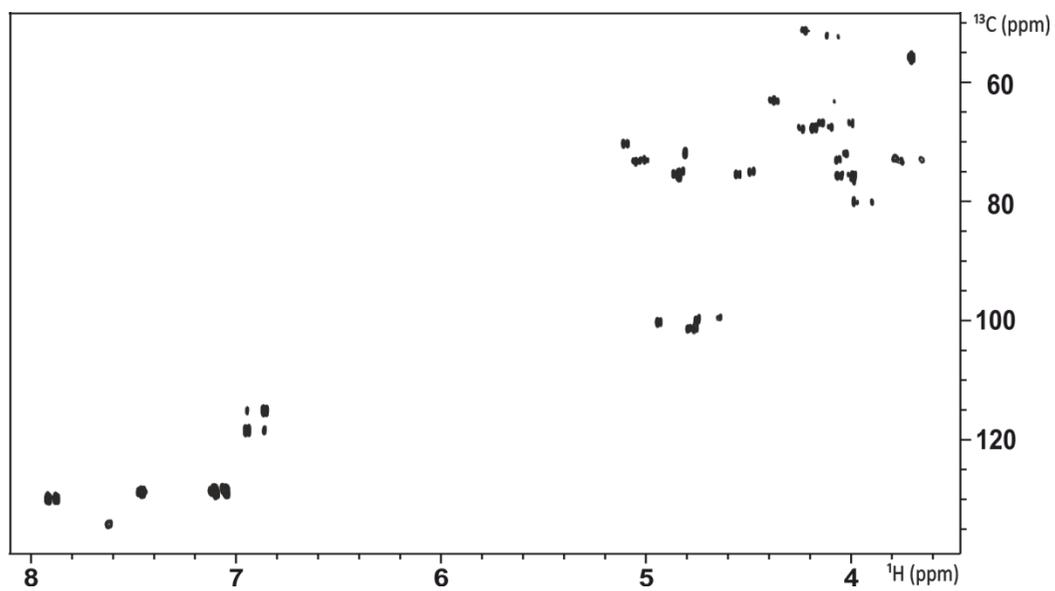
Espectro bidimensional TOCSY para el disacárido **15** a 298K y 600 MHz.



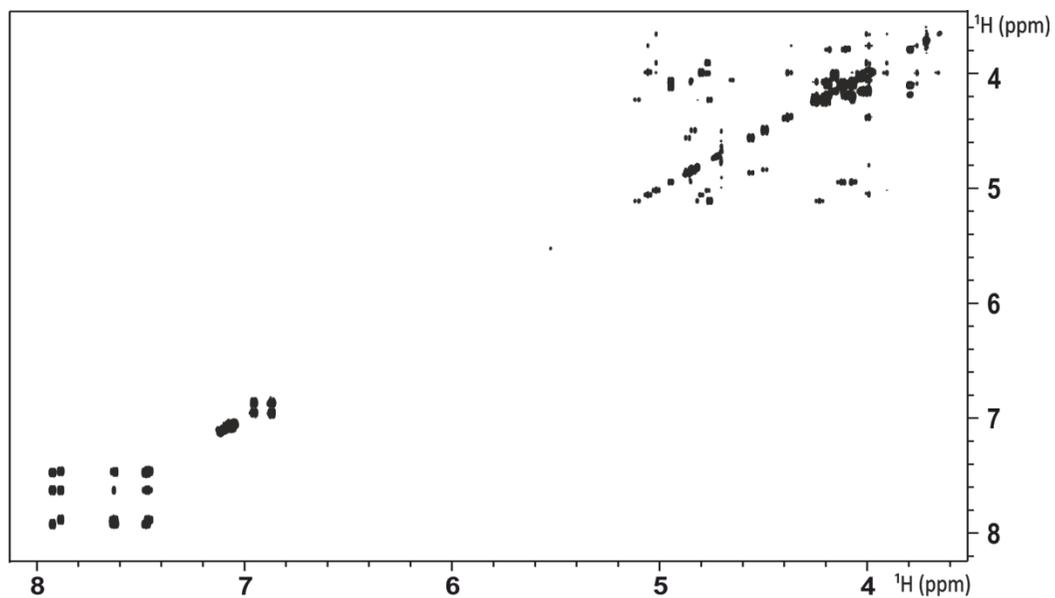
Curvas de crecimiento del NOE para los 2 anillos del disacárido **15** a 298K y 600 MHz.  
Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).



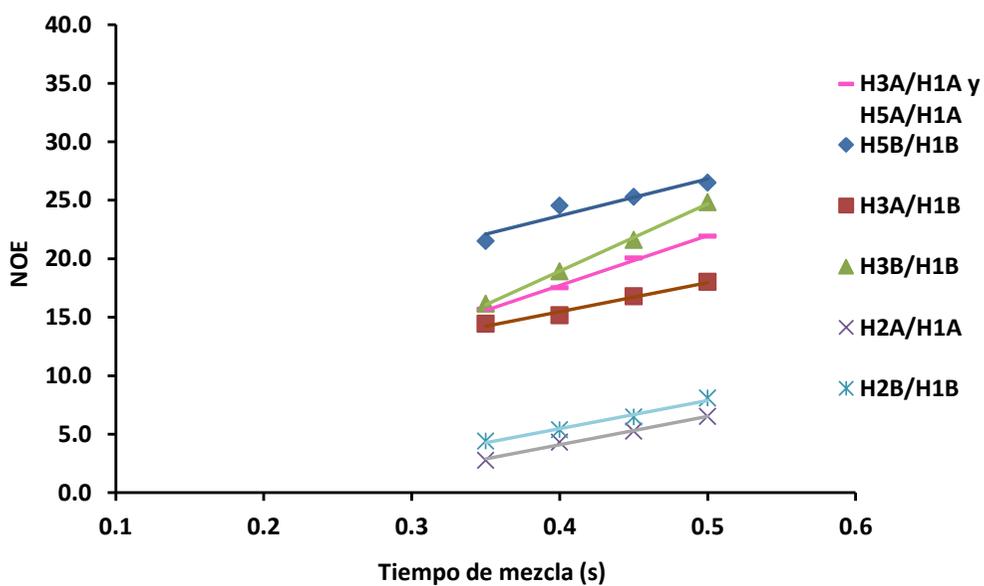
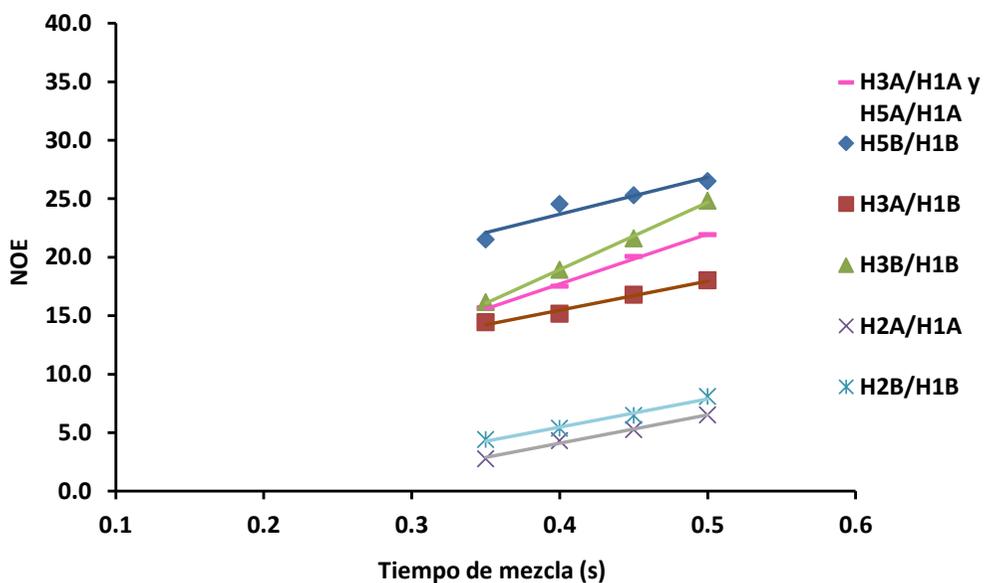
Espectro monodimensional para el pentasacárido **16** a 298K y 600 MHz.



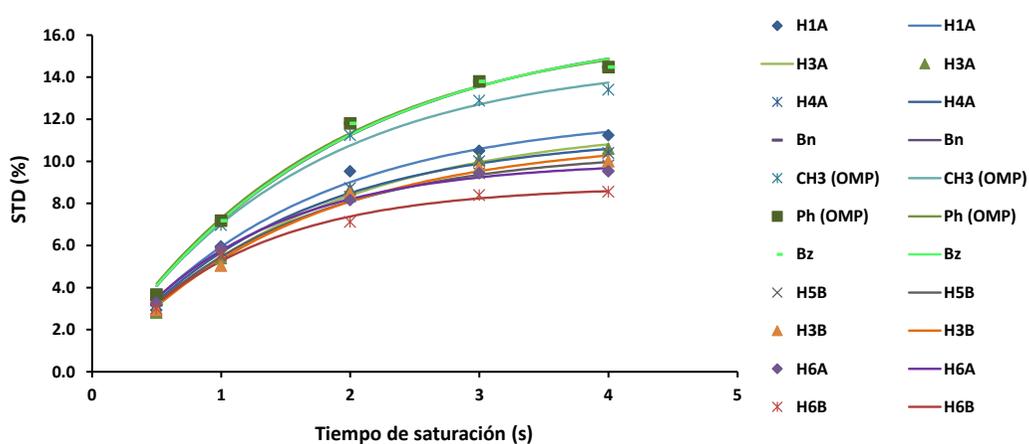
Espectro bidimensional HSQC para el pentasacárido **16** a 298K y 600 MHz.



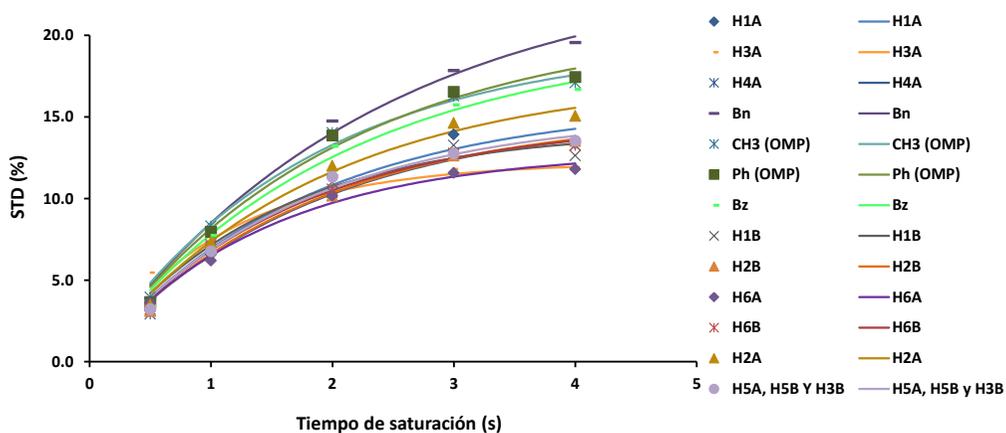
Espectro bidimensional TOCSY para el pentasacárido **16** a 298K y 600 MHz.



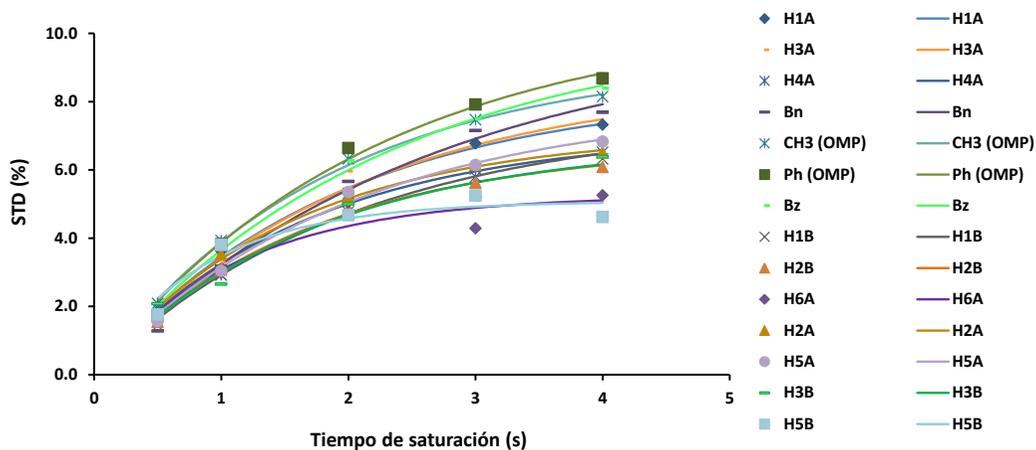
Curvas de crecimiento del NOE para los 4 anillos que se han podido medir para el pentasacárido **16** a 298K y 600 MHz. Las líneas representan un ajuste lineal de los valores experimentales (símbolos).



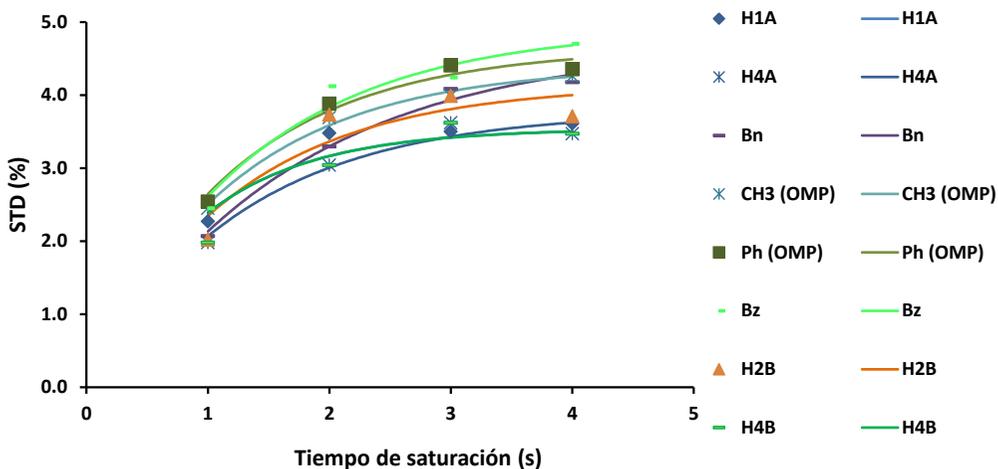
Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado con el disacárido **11**.



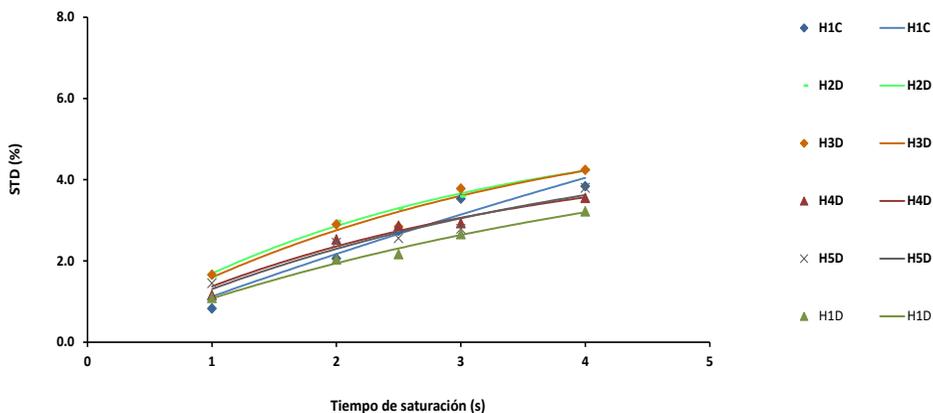
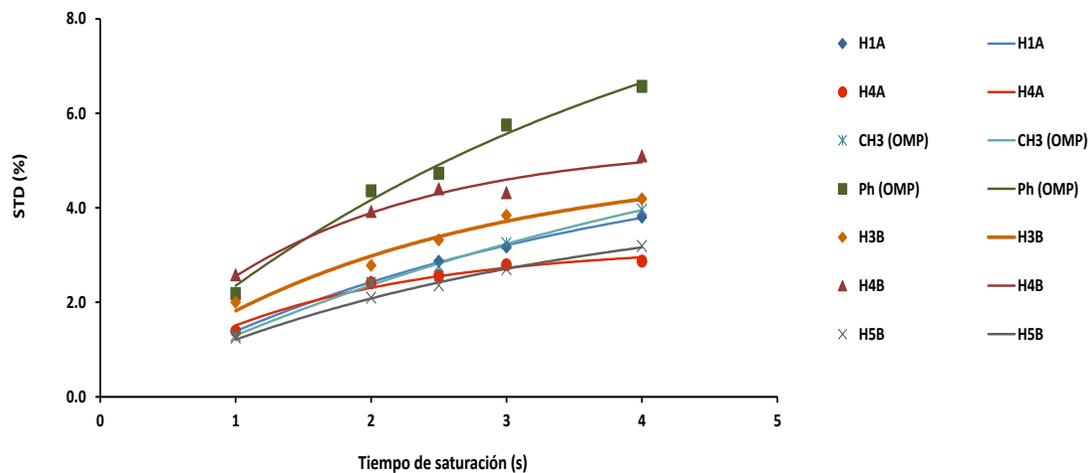
Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado con el disacárido **12**.



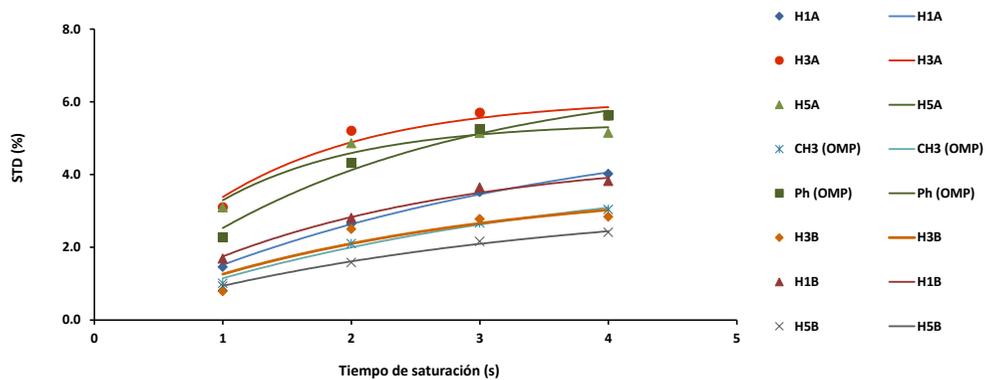
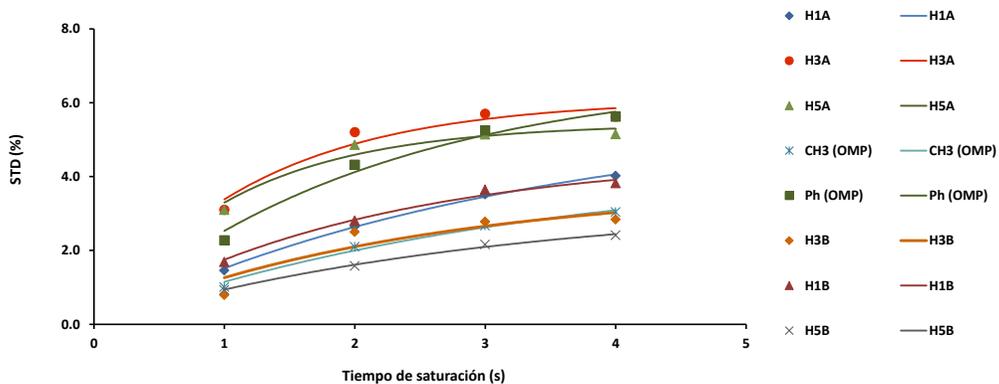
Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado con el disacárido **13**.



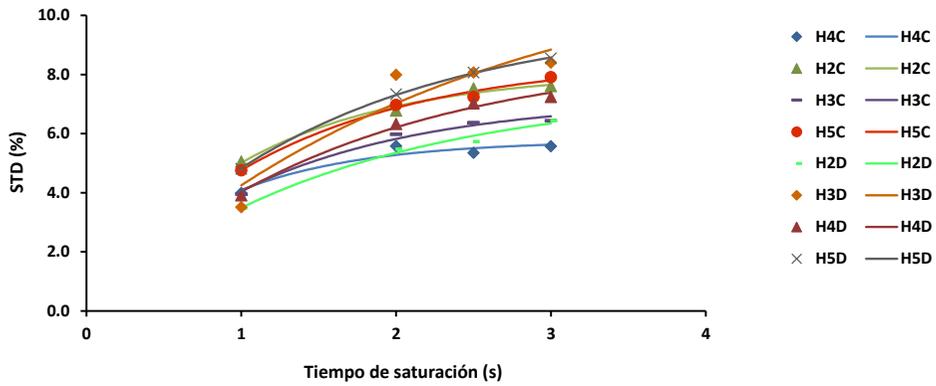
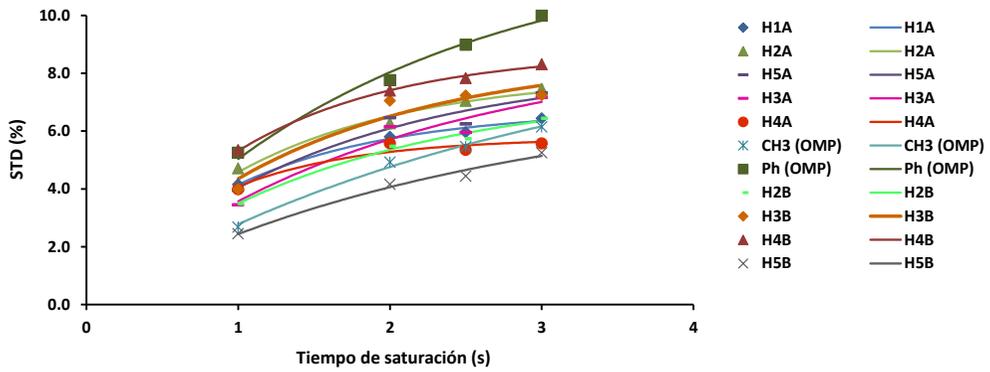
Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado con el disacárido **15**.



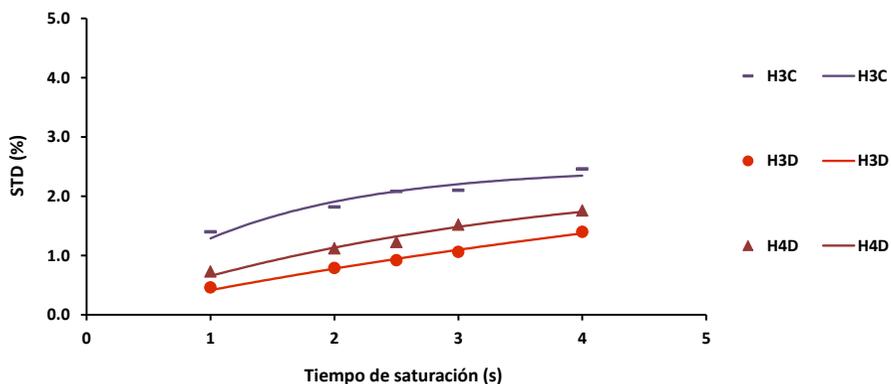
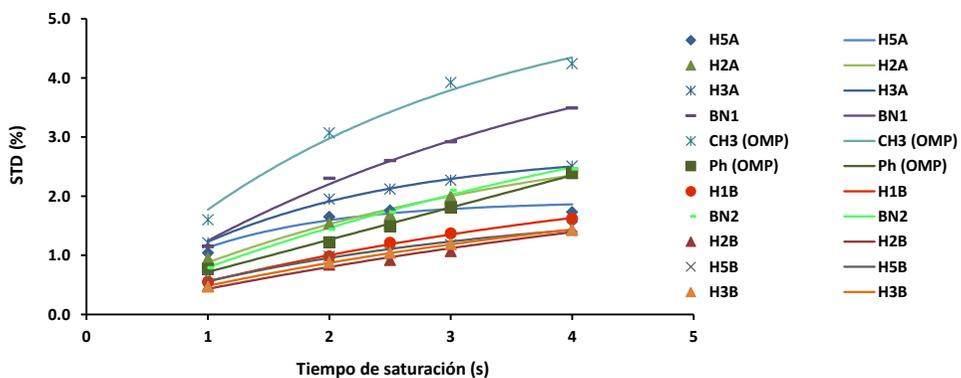
Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado por el tetrasacárido **3** con la Pleiotrofina.



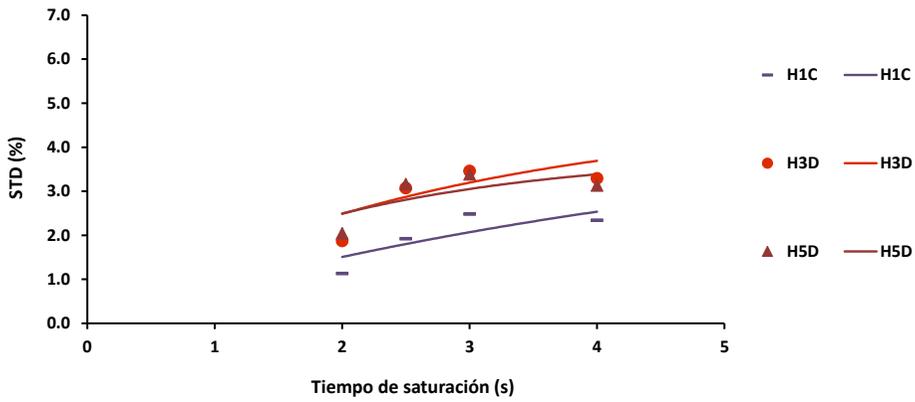
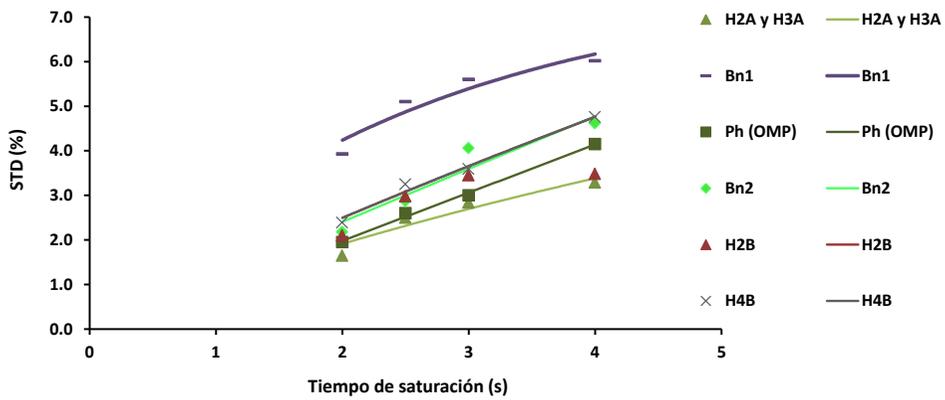
Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado por el tetrasacárido **7** con la Pleiotrofina.



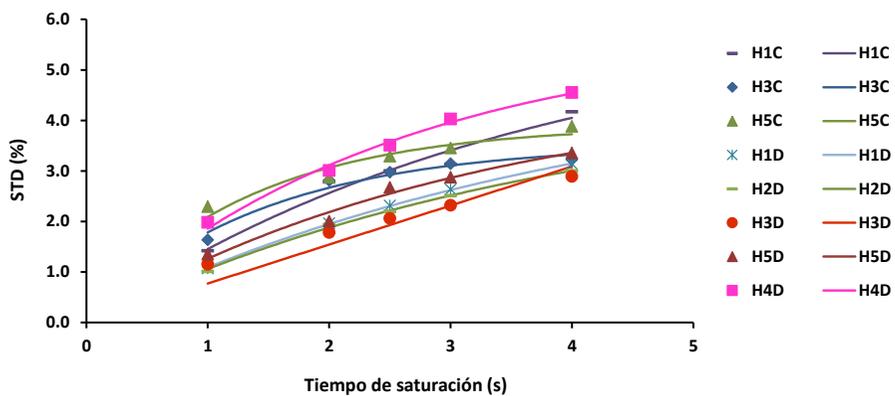
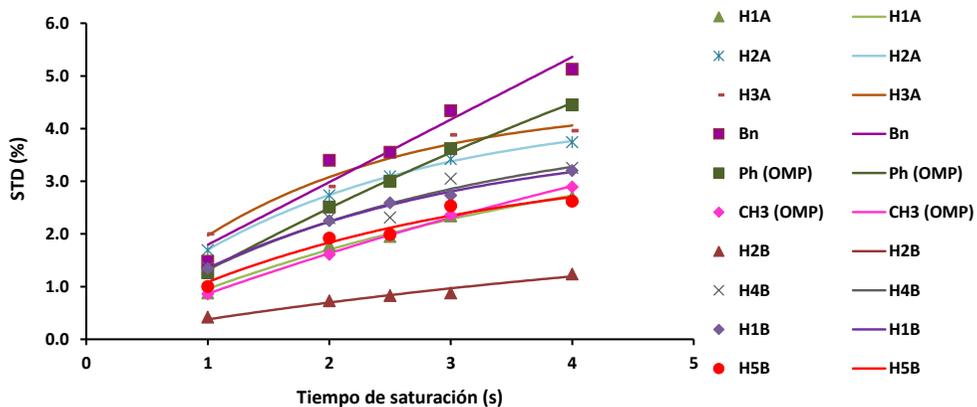
Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado por el tetrasacárido **10** con la Pleiotrofina.



Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado por el tetrasacárido **2** con la Pleiotrofina.



Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado por el tetrasacárido **5** con la Pleiotrofina.



Representación de los valores de STD experimentales (símbolos) y un ajuste mediante la ecuación de Box Lucas (líneas) para el complejo formado por el tetrasacárido **8** con la Pleiotrofina.