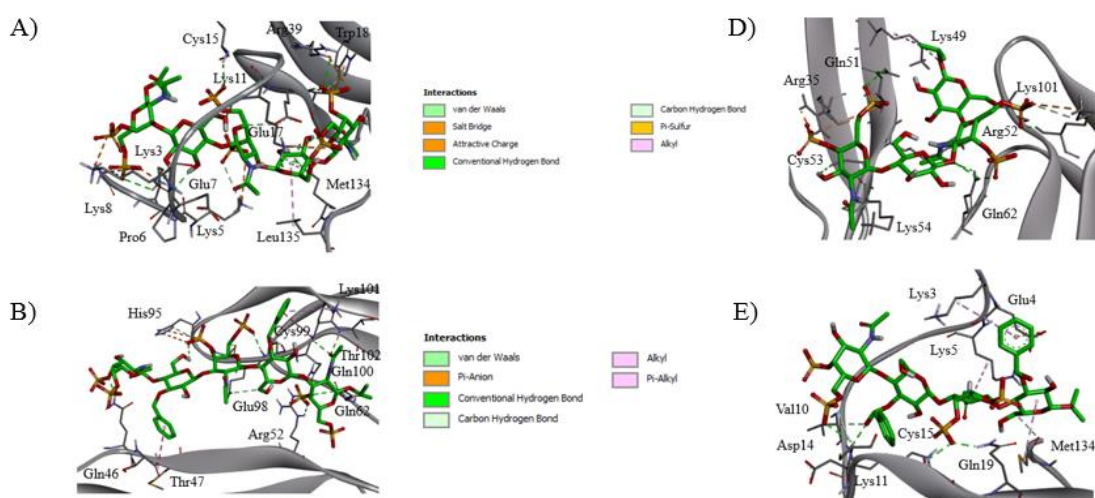


Anexo II. Descripción de las interacciones propuestas por Docking Molecular entre Pleiotrofina y Midkina y los Miméticos de GAG.

➤ Pleiotrofina

Dentro de los acoplamientos entre el ligando azúcar y la PTN se establecen diferentes interacciones siendo algunas de ellas comunes en los seis complejos. En primer lugar, para la conformación plegada de la PTN (PTN4), las interacciones comunes ligando-proteína resultan ser aquellas que tienen lugar mediante puentes salinos y atracción de cargas protagonizadas por lisinas y argininas (Figura 1.A). Como ejemplo de estas interacciones más comunes encontramos la generación de puentes salinos por atracción de cargas entre residuos como Arg35 (D) y Lys5 (A) entre otros, con los oxígenos de los grupos sulfato. Un tipo especial de enlaces de hidrógeno son las uniones C-H...O que, a pesar de ser más débiles que las convencionales, son muy frecuentes en este tipo de biomoléculas. Un ejemplo representativo del enlace clásico sería el residuo Glu17 con hidrógenos alifáticos del residuo de glucosa (A) o uniones C-H...O entre las lisinas y argininas con los oxígenos de los grupos sulfato.

Una vez detalladas las interacciones más representativas, se describen las uniones que tienen lugar con la presencia de grupos protectores en la estructura del azúcar, donde tanto los sistemas π como los átomos electronegativos van a aumentar las interacciones con la proteína estableciéndose nuevos tipos de uniones. Las más comunes son las que se establecen entre un sistema π con un anión, grupo alquílico o el azufre de los sulfatos. Como ejemplo de cada uno de estos casos serían Glu4 y Lys3 con los anillos bencílicos del azúcar (E), y la His95 con los azufres de los grupos sulfato (B). Además de todas estas interacciones, la presencia de los grupos CF₃ en la estructura del azúcar va a generar enlaces con los átomos de Flúor de este residuo, véase el caso de los aminoácidos Lys8 (F) y Trp20 (C) en la Figura 1.A.



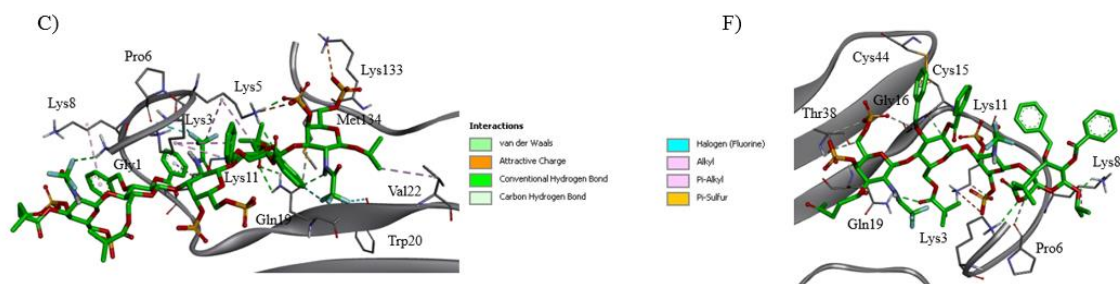


Figura 1.A. En la figura se representan los complejos entre los derivados pentasacarídicos, **1**, **2** y **3**, izquierda, y tetrasacarídicos **4**, **5** y **6** derecha, para los ligandos desprotegidos (arriba), dibencilados (centro) y persustituídos (abajo), con la conformación plegada de la PTN. En el centro se indican las interacciones más representativas. Esta imagen corresponde a la Figura 4.15 del Capítulo 4.

Siguiendo con la estructura lineal de la PTN, una vez más, las uniones por atracción de carga o puente salino entre lisinas y argininas principalmente con los oxígenos de los grupos sulfato son predominantes (Figura 2.A). Dentro de las uniones C-H...O encontramos de nuevo aminoácidos que involucran dicha unión al H alifático de sus cadenas como es el caso de los residuos de Hys95(B), Leu79 (A) y Lys101(C) uniéndose a los átomos de oxígeno de los grupos sulfato; o por el contrario son los oxígenos de los grupos hidroxilo de los aminoácidos los que interactúan con los hidrógenos del azúcar, véase Asp78 (D) y Ser121 (E). Se da una situación similar en los enlaces de hidrógeno, donde se observan dos uniones: por un lado, la interacción N-H...O como por ejemplo Arg86 (F), Leu79 (E), His98 (B) o Gly75 (D); y por otro lado uniones C-O-H...O como es el caso de Thr113 (A). Para este último caso, los oxígenos participantes, para los complejos con el ligando completamente desprotegido, son aquellos que se encuentran en los grupos sulfatos; mientras que en los dibencilados o completamente protegido, son los que forman parte de los residuos de las cadenas laterales de los carbohidratos. Dentro de la categoría π -donor hydrogen en la cual el hidrógeno aceptor perteneciente a un sistema aromático se une a otro dador, se encuentra como ejemplo representativo el residuo de Trp74(A) con un grupo hidroxilo del ligando.

Como último ejemplo de las interacciones clásicas se encuentran aquellas que se establecen entre grupos alquílicos por ambas partes, en nuestro caso particular podemos encontrarlas interactuando con el grupo isopropilo, véase los aminoácidos Lys124 (A) y Leu79 (D); o con el residuo azúcar como Lys123 (E).

Una vez analizadas las interacciones más típicas, procedemos a identificar aquellas que aparecen entre sistemas aromáticos tras la presencia de grupos bencilos y benzoilos en el ligando. A diferencia de las interacciones π que se encontraron en los ligandos desprotegidos (1-PTN y 4-PTN), la presencia de anillos aromáticos en la estructura de **2-3**, **4-5** genera las uniones tipo π - π -T shaped y π - π stacked descritas en el capítulo. En nuestro caso, la primera de ellas puede observarse en la unión que se establece entre el residuo de Phe71 con el grupo Bn del azúcar, a una distancia de 4.98 Å; mientras que en el segundo caso ocurre entre el residuo de Tyr69 con el grupo Bz (ambas en el complejo tetrasacarídico (F)).

Dentro de estas interacciones aromáticas, también se pueden encontrar aquellas que se establecen con un átomo cargado. Un ejemplo representativo de esta unión tiene lugar en el complejo con el ligando pentasacarídico persustituído (C) entre el Asp78 con el grupo Bz del azúcar (π -anión). También se observa interacción entre el Trp74 con el azufre del sulfato (π -sulfur).

También se establece una interacción entre la nube de electrones π de un grupo aromático con cualquier residuo alquílico sin necesidad de que se establezca en el centroide de este; un ejemplo de esto sería la unión entre el sistema aromático del Bn con la Lys 101, o por el contrario el grupo imidazol de la Hys95 con un anillo de azúcar (ambos para el compuesto B, 2-PTN3).

También aparecen de nuevo, para los complejos con el ligando completamente protegido las interacciones entre los átomos de flúor del CF_3 y oxígeno de aminoácidos como Tyr69 (F). Estas interacciones más representativas están reflejadas en la Figura 2.A.

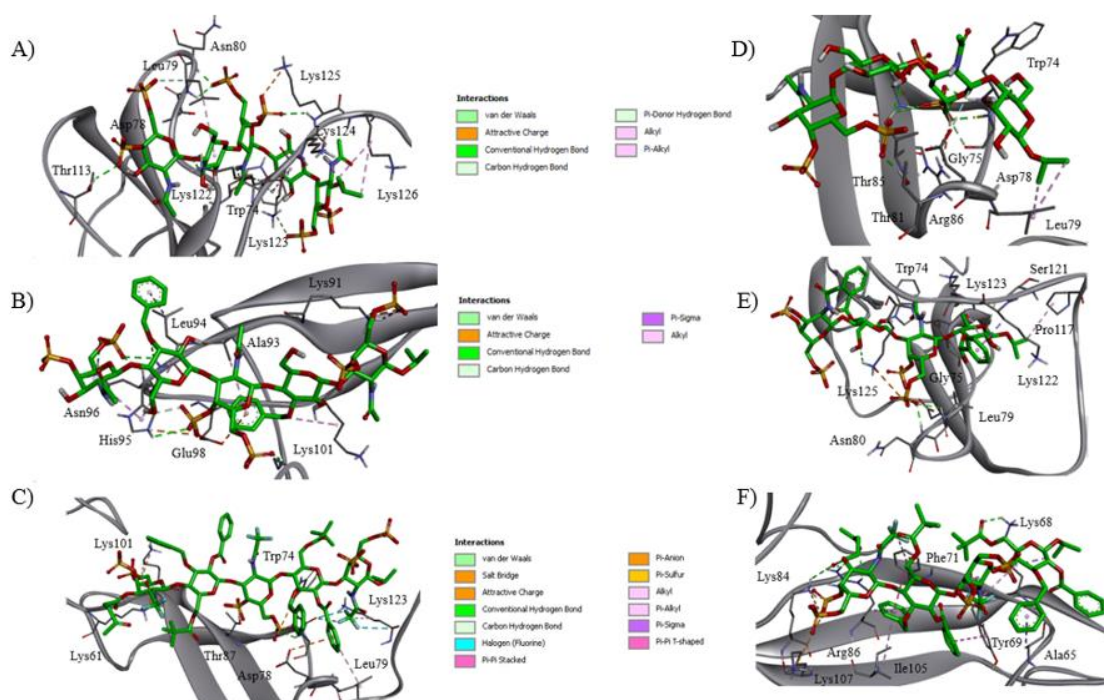


Figura 2.A. En la figura se representan los complejos entre los derivados pentasacarídicos, 1, 2 y 3, izquierda, y tetrasacarídicos 4, 5 y 6 derecha, para los ligandos desprotegidos (arriba), dibencilados (centro) y persustituídos (abajo), con la conformación lineal de la PTN. En el centro se indican las interacciones más representativas. Esta imagen corresponde a la Figura 4.18 del Capítulo 4.

En el caso de la conformación horquilla de la PTN dentro las interacciones comunes, una vez más se tiene como protagonistas los residuos de Arg y Lys como, por ejemplo, Arg52(F), Arg86 (E), Lys8 (D), Lys12 (B) y Arg35 (A) con los oxígenos de los grupos sulfato (Figura 3.A). Dentro de las interacciones C-H, los hidrógenos alifáticos de los aminoácidos establecen interacciones en el caso de los complejos con el azúcar completamente protegido, con los átomos de F del CF_3 (Lys60 y Lys107). Para los complejos con el ligando dibencilado y desprotegido existe una interacción con los átomos de oxígeno del residuo de azúcar, por ejemplo, Lys60 (E), Lys11 (D) y Gln19

(A). Para los enlaces de hidrógeno convencionales, aparecen interacciones entre C-H...O=C como es el caso de Lys61 (F) y Trp20 (A) ó C-H ...O=S en Thr113 (C), O-H...O-H como por ejemplo Ser13 (D) y N-H...O véase Phe71 (E) o Gln118 (B). Las interacciones alquilo-alquilo aparecen en nuestro caso en residuos de Lys entre cadenas alifáticas como Lys112 (A y F), y en sistemas alifáticos como por ejemplo Lys60 (E) y Lys12 (B).

Las otras interacciones que pueden observarse con los sistemas aromáticos ya se describieron en la conformación lineal de la PTN y se muestran en la Figura 3.A algunos de estos ejemplos. Para poder distinguir entre las interacciones π - σ y π -alquil, debemos entender primero el tipo de enlace que se establece en ambos casos. Para el primero de ellos, se puede considerar un enlace C-H ... π débil donde el hidrógeno que actúa como donador de electrones debe estar unido a un átomo de carbono no aromático, como ejemplo encontramos la unión entre Lys122 con el residuo Bn (E). Dentro de las interacciones hidrofóbicas entre sistemas aromáticos encontramos como ejemplo: π - π *T-shaped*, entre el anillo del residuo de Phe71 con el grupo bencilo del azúcar (E); y por otro lado las π -alquil en donde el anillo aromático puede pertenecer al ligando como es el caso de la Lys122 con el grupo Bn (B), o formar parte del aminoácido, como Trp59 unido al CF₃ (C). Por último, encontramos las uniones entre residuos cargados y sistemas π , en cuyo caso observamos interacción entre un residuo cargado positivamente como Arg896 con el grupo Bn (F); o en cambio aminoácidos aromáticos como Phe63 o Trp59 con los oxígenos de los grupos sulfato cargados negativamente.

Cabe añadir que, en los ligandos completamente protegidos, la presencia del grupo CF₃ genera nuevas interacciones entre los átomos de F y oxígenos de los aminoácidos, por ejemplo, Asn58(F) y Cys57 (C).

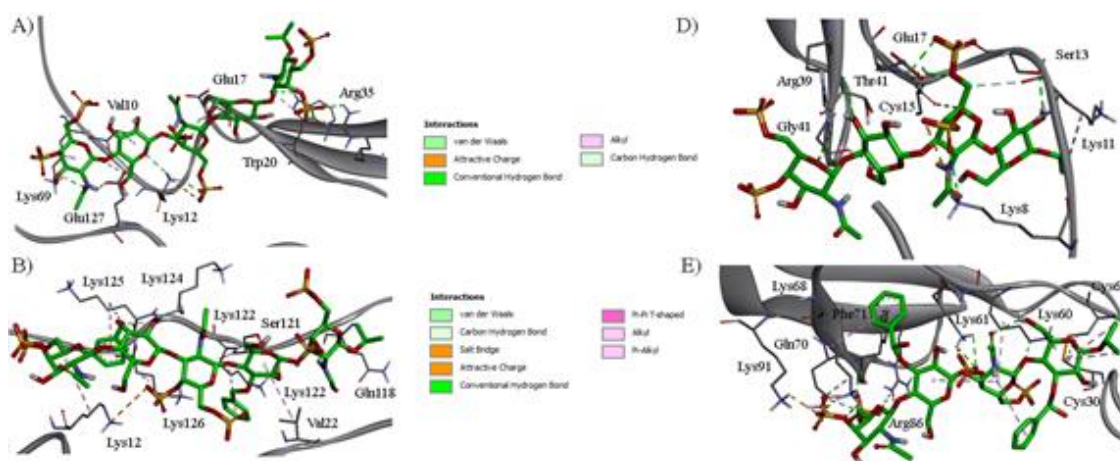




Figura 3.A. En la figura se representan los complejos entre los derivados pentasacarídicos, **1**, **2** y **3**, izquierda, y tetrasacarídicos **4**, **5** y **6** derecha, para los ligandos desprotegidos (arriba), dibencilados (centro) y persustituídos (abajo), con la conformación de bisagra de la PTN. En el centro se indican las interacciones más representativas. Esta imagen corresponde a la Figura 4.21 del Capítulo 4.

➤ *Midkina*

En este caso sólo se han estudiado las interacciones con la serie pentasacarídica, compuestos **1**, **2** y **3**.

En general, se encuentran interacciones carga-carga con los oxígenos de los grupos sulfatos como por ejemplo con la Lys105 (3-MK4); o enlaces de hidrógeno como Asp76 (2-MK4), Gly31 (1-MK4). Dentro de estas interacciones no covalentes entre un heteroátomo e hidrógeno, un ejemplo sería la interacción entre el sustituyente bencilo del ligando dibencilado **2** y el residuo Asp76 C-H...O, y la Cys67 con el oxígeno del residuo de Lev (Figura 4.A-B)

Adicionalmente, la presencia de sistemas aromáticos en el ligando establece nuevas uniones no covalentes (Figura 4.A-B y 4.A.C) como serían las π -alkil de la Lys10 o la Pro106 con el anillo aromático del grupo protector del azúcar, o las π - σ entre el residuo Thr85 con el anillo aromático de la Glc B en el complejo con el ligando persustituído **3** (Figura 4.A.B). También se observan interacciones π -anión entre un grupo cargado (SO_3^-) y la Phe69 como ocurre en el ligando completamente desprotegido **1** (Figura 4.A-A) y π -catión véase Lys105 y el anillo de benzoilo del azúcar. Al mismo tiempo, la presencia de átomos de F en el ligando establece interacciones halogenadas, en este caso en una unión C-F...O=C carbonilo del residuo de Ser102 (Figura 4.A-C).

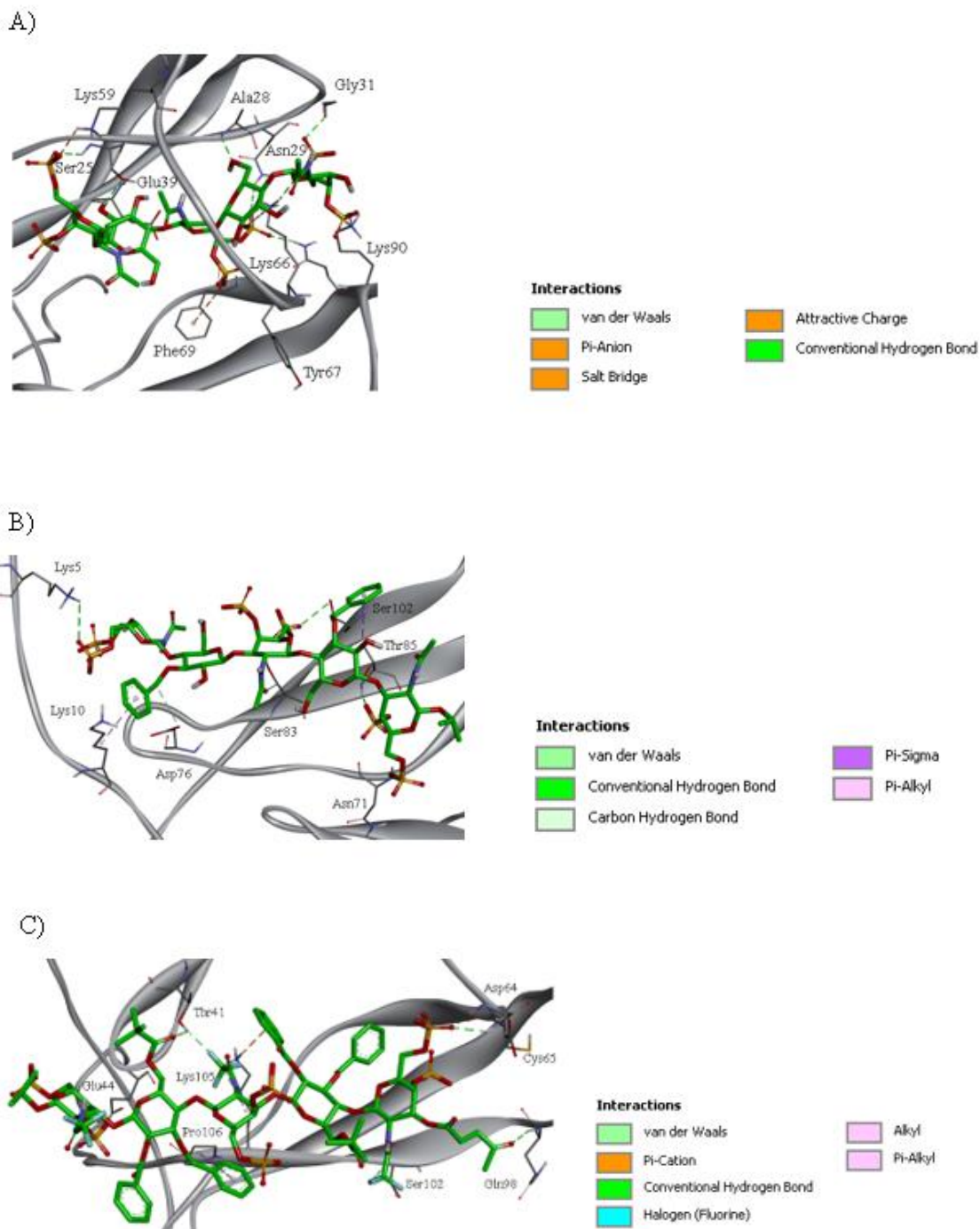
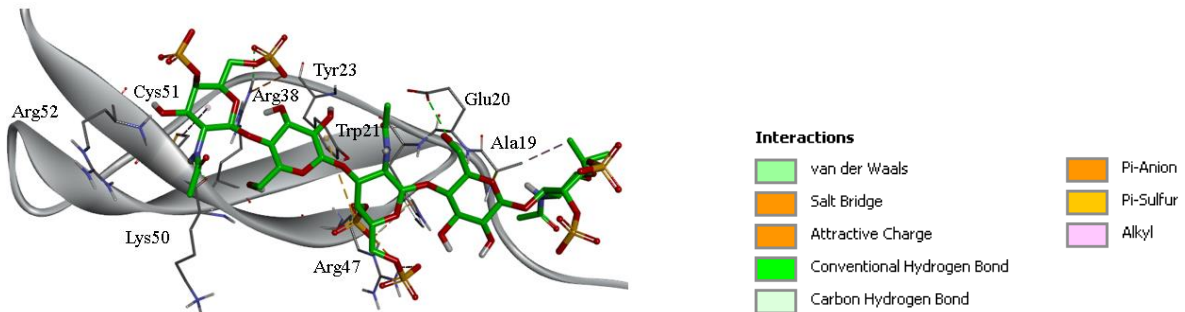


Figura 4.A. En la figura se representan los complejos entre los derivados pentasacarídicos, **1**, **2** y **3** (ligando desprotegido, arriba; dibencilado, centro; y persustituído, abajo) y la conformación plegada de la MK. A la derecha se indican los tipos de las interacciones más representativas. Esta imagen corresponde a la Figura 5.6 del Capítulo 5.

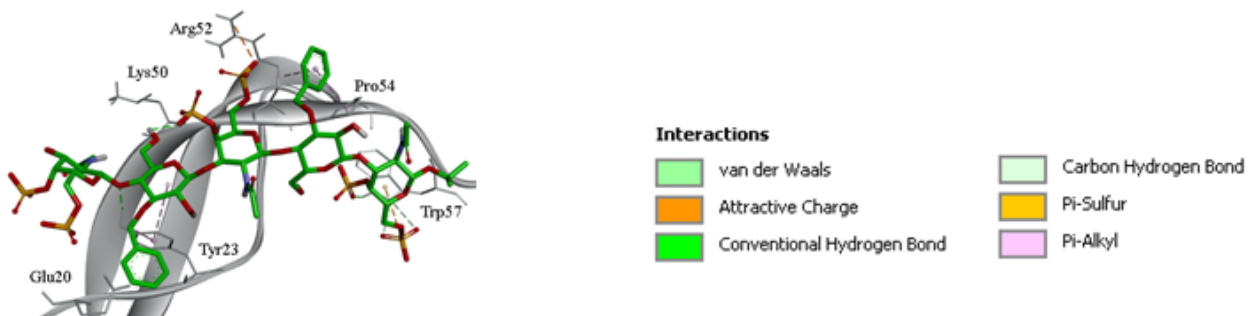
Con respecto a la conformación lineal de la MK, en lo que respecta a las interacciones con los aminoácidos básicos, todos los complejos presentan uniones por puentes de hidrógeno con Arg52 y Lys50. Además, el compuesto **1** tiene más interacciones no covalentes que con la conformación proteica anterior: Interacciones π -azufre entre la

Tyr23 y el azufre del grupo sulfato de la GalNac C; π -anión entre el oxígeno del grupo sulfato de la GalNac E y el Trp21. Para los ligandos que presentan residuos bencílicos estos vuelven a intervenir en la interacción con aminoácidos aromáticos como Trp57 y Tyr23 (Figura 5.A).

A)



B)



C)

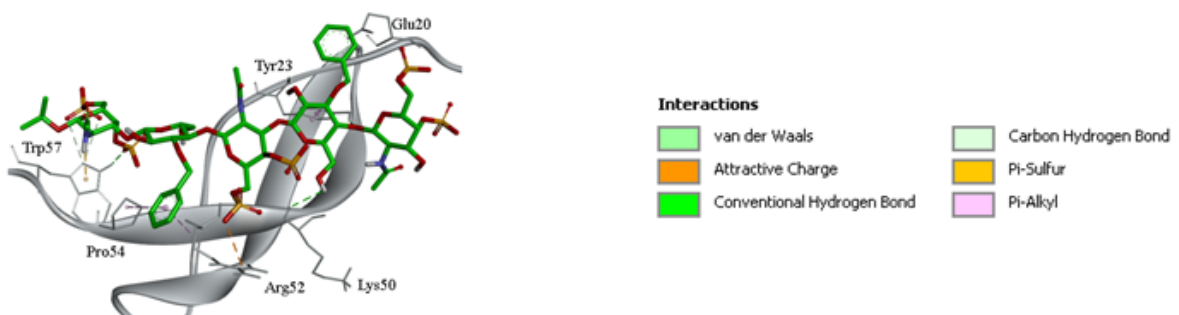


Figura 5.A. En la figura se representan los complejos entre los derivados pentasacarídicos, **1**, **2** y **3**, (ligando desprotegido, arriba; dibencilado, centro; y persustituído, abajo) y la conformación lineal de la MK. A la derecha se indican los tipos de las interacciones más representativas. Esta imagen corresponde a la Figura 5.8 del Capítulo 5.

En la última conformación de la MK, las uniones que aparecen son similares a los casos anteriores, generándose una vez más los enlaces de hidrógeno con los residuos de Lys y Arg principalmente. La Phe69 establece uniones con los grupos sulfato de la GalNAc C y la Gly62 uniones C-H...O. Dentro de las interacciones aromáticas entre sistemas aromáticos, para el ligando **3** se encuentran la mayoría de las interacciones anteriormente descritas, como π -sigma con Trp72, π -alquil con el anillo aromático del residuo de Tyr23 o entre el bencilo del ligando y la Arg38. Por otro parte, los contactos entre residuos alquílicos como el isopropilo y la Lys48 o interacciones halogenadas en este último aminoácido entre el grupo carbonilo y los átomos de flúor del azúcar, vuelven a estar presentes (Figura 6.A).

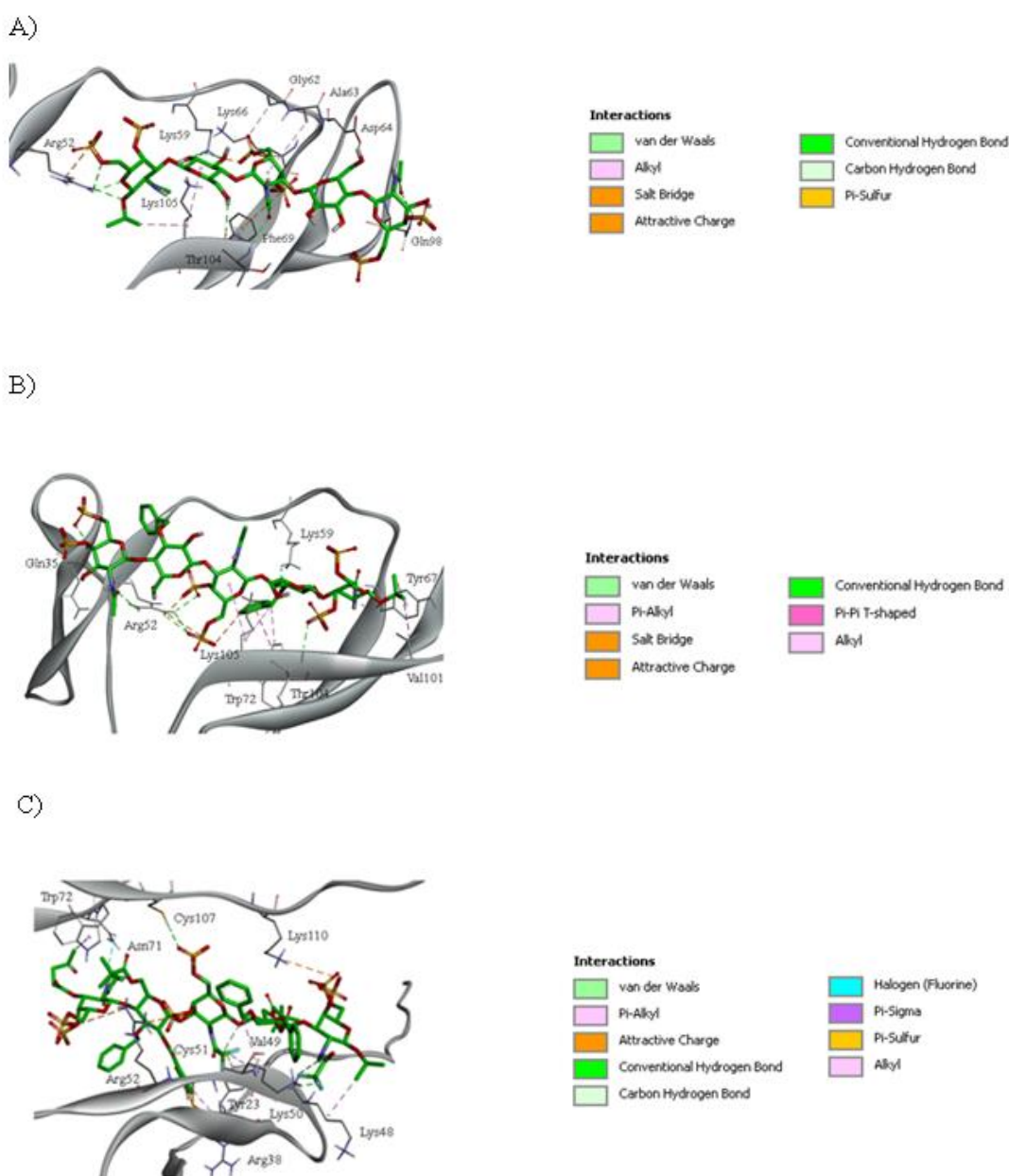


Figura 6.A. En la figura se representan los complejos entre los derivados pentasacáridicos, **1**, **2** y **3**, (ligando desprotegido, arriba; dibencilado, centro; y persustituído, abajo) y la conformación bisagra de la MK. A la derecha se indican los tipos de las interacciones más representativas. Esta imagen corresponde a la Figura 5.10 del Capítulo 5.

