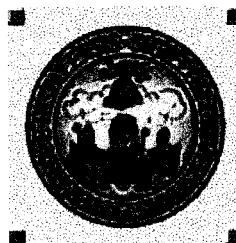


b15699973
i19335052



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS ISLA DE LA CARTUJA

T/877



DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA ORGÁNICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 001 número 122 del libro
correspondiente.

Sevilla, 2 OCT. 2002

El Jefe del Negociado de Tesis,

**Estudio de la estructura tridimensional y de la dinámica de
oligosacáridos modelos de glicosaminoglicanos mediante
RMN y simulaciones de dinámica molecular**

MEMORIA presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por

Jesús Angulo Álvarez
Sevilla, 2002

Esta tesis doctoral se ha llevado a cabo con la ayuda de una beca predoctoral de la Fundación Ramón Areces. El trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (proyecto PB96-0820).

D. PEDRO MANUEL NIETO MESA, Científico Titular del C.S.I.C.

CERTIFICA: Que el presente trabajo titulado: "Estudio de la estructura tridimensional y de la dinámica de oligosacáridos modelos de glicosaminoglicanos mediante RMN y simulaciones de dinámica molecular" ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento, en el Grupo de Carbohidratos, en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas, del Centro de Investigaciones Científicas Isla de La Cartuja (Sevilla) durante los años académicos 1998-1999, 1999-2000, 2000-2001 y 2001-2002, constituyendo la Memoria que presenta el Lcdo. Jesús Angulo Álvarez para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Septiembre de 2002

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pedro M. Nieto Mesa', written over a horizontal line.

Fdo.: Pedro M. Nieto Mesa

INDICE

Capítulo 1.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1 ANTECEDENTES GENERALES. EL CONTEXTO BIOLÓGICO	3
1.2 RESULTADOS DE NUESTRO LABORATORIO	17
1.3 OBJETIVOS	21
BIBLIOGRAFÍA	24
Capítulo 2.- ESTRUCTURA Y DINÁMICA POR RMN	27
2.1 INTRODUCCIÓN. RMN PARA LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE OLIGOSACÁRIDOS	29
2.2 OBJETIVOS	46
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
2.4 PARTE EXPERIMENTAL	106
BIBLIOGRAFÍA	109
Capítulo 3.- ESTRUCTURA Y DINÁMICA POR MODELIZACIÓN MOLECULAR	113
3.1 INTRODUCCIÓN	115
3.2 OBJETIVOS	131
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	132
3.4 CONCLUSIONES	179
3.5 PARTE EXPERIMENTAL	181
BIBLIOGRAFÍA	188
ANEXOS	191

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En esta tesis doctoral se presentan los estudios estructurales mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear y cálculos teóricos de oligosacáridos sintéticos tipo heparina y sulfato de heparano. Estos carbohidratos han sido diseñados con el objeto de contribuir a la comprensión de la relación estructura-actividad del proceso de activación de los factores de crecimiento para fibroblastos (FGF) por glicosaminoglicanos (GAGs). El trabajo que se expone en esta memoria constituye parte de un proyecto más amplio, que abarca la síntesis de oligosacáridos modelo, evaluación de su actividad biológica y afinidad por las diferentes proteínas involucradas en este proceso de activación. El fin último sería la elucidación de las bases moleculares de este proceso de activación y el origen de su selectividad.

1.1 ANTECEDENTES GENERALES, EL CONTEXTO BIOLÓGICO

1.1.1 LOS GLICOSAMINOGLICANOS COMO MEDIADORES EN PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN EXTRACELULAR

La señalización extracelular es uno de los campos en los que se están fortaleciendo las teorías que conceden un papel clave a los carbohidratos en procesos de reconocimiento molecular biológicos. El medio extracelular de las células animales ha sido definido como “*un medio intensamente social y ruidoso de charla intracelular*”.¹ Las células intercambian incesantemente información regulando mutuamente sus actividades para mantener un comportamiento colectivo. Esta situación, en la que diversas señales circulan en el mismo espacio abierto – la matriz extracelular-, implica la existencia de un alto nivel de selectividad y especificidad de la interacción a nivel molecular. Gran parte de esta selectividad se atribuye a las glicofomas que abundan en la matriz extracelular, concretamente a la alta capacidad de los carbohidratos para generar diversidad estructural. Concretamente dentro de los carbohidratos presentes en la matriz extracelular son especialmente interesantes los ésteres de sulfato que se encuentran exclusivamente en la matriz extracelular. Entre estos se encuentran los glicosaminoglicanos que constituyen uno de los componentes dominantes de

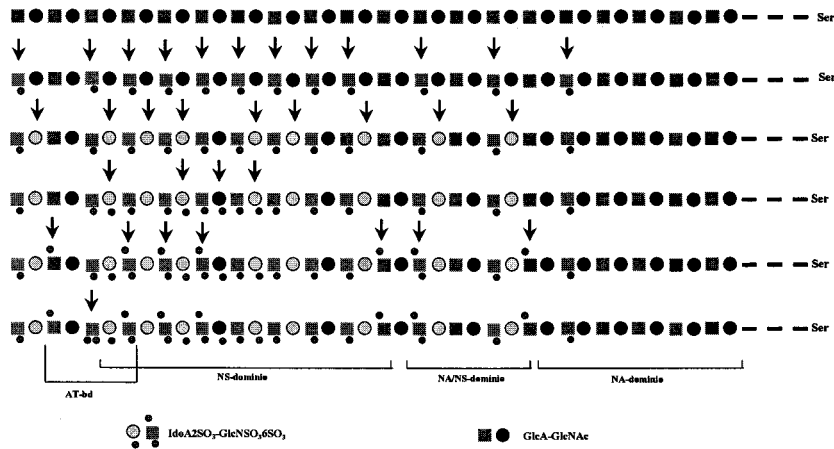
la composición de este medio. Además de funciones puramente estructurales (el keratan sulfato es el componente base de del cartílago), algunos de estos glicosaminoglicanos, especialmente heparina y heparan sulfato están involucrados en un gran número de procesos de reconocimiento molecular extracelulares. Entre estos se pueden destacar la regulación de la actividad antitrombótica de la antitrombina, la señalización de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos, adhesión celular, unión de citoquinas y quimioquinas e infección por bacteria y virus.²

Resulta paradójica la participación de la heparina o el heparan sulfato en estos procesos tan regulados puesto que su ubicuidad parecería, en principio, opuesta a cualquier tipo de selectividad. Para resolver esta aparente contradicción es necesario considerar en detalle la heterogeneidad en la estructura química de estos polisacáridos.³ Aunque se pueden reconocer unos patrones mayoritarios – secuencia regular – en los GAGs hay suficientes posibles pequeñas heterogeneidades como para justificar el nivel de selectividad necesario en estos procesos biológicos. De hecho, recientemente estos compuestos se han sido propuestos como catalizadores y reguladores del reconocimiento molecular fundamentándose en características de su biosíntesis como son diferencias a nivel celular y tisular y rápidas respuestas a señales, medio y edad.⁴

1.1.1.1 Estructura de los glicosaminoglicanos

La naturaleza heterogénea del glicosaminoglicano es la consecuencia directa de que el sulfato de heparano sea, en realidad, una familia de polisacáridos estrechamente relacionados de la que la heparina no es más que un miembro más, altamente sulfatado. La compleja biosíntesis de estas moléculas tiene como consecuencia la generación de varias combinaciones de secuencias oligosacáridicas con unidades de D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina, N-sulfo-D-glucosamina, ácido D-glucurónico y ácido L-idurónico diferentemente sulfatadas, y todas aparecen unidas con enlace glicosídico α (1→4) con la

excepción de las unidades de ácido D-glucurónico que se presentan unidas con enlace glicosídico β (1 \rightarrow 4)⁴. (Figuras 1.1a y 1.1b).



AT-bd dominio constituido por el pentasacárido que interacciona con la antitrombina (AT-III)
 NS dominio constituido por el disacárido N-sulfato
 NA dominio constituido por el disacárido con N-acetilo
 NA/NS dominio constituido por el disacárido que alterna grupos N-sulfato y grupos N-acetilo en la glucosamina.

Figura 1.1a Representación de la biosíntesis del sulfato de heparano y de su biosíntesis.

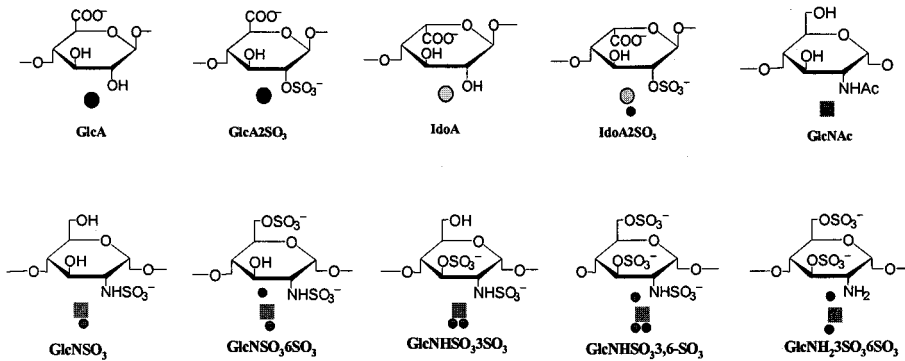


Figura 1.1b Estructura química de los monómeros que componen el sulfato de heparano.

1.1.1.2 Activación de FGFs

Los FGFs constituyen una familia de más de veinte polipéptidos de señalización que participan en una variedad de funciones biológicas incluyendo la proliferación y la diferenciación celular y la angiogénesis^{5,6}. Estos factores de crecimiento ejercen su actividad biológica tras interactuar con receptores transmembranales específicos, de tipo tirosina quinasa, situados en la superficie celular, que reciben el nombre de receptores de factores de crecimiento para fibroblastos (FGFRs) o receptores de alta afinidad. Estos receptores también componen una familia de la que hasta ahora se han descrito cuatro miembros⁷.

La actividad de los FGFs está estrechamente regulada por glicosaminoglicanos de tipo heparina o sulfato de heparano — polisacáridos lineales compuestos de unidades alternadas de D-glucosamina y un ácido urónico, L-idurónico o D-glucurónico, con diferente grado de sulfatación⁸— con los que interactúan también, y a los que se les denomina receptores de baja afinidad en la descripción del proceso biológico. Los FGFs pertenecen, por tanto, al amplio grupo de proteínas cuya actividad depende de heparina o sulfato de heparano^{9,10} y, muy posiblemente, son las mejor estudiadas del grupo con la sola excepción de la antitrombina III.

Se acepta generalmente que los FGFs se activan por interacción con el glicosaminoglicano (receptor de baja afinidad) y, una vez activados, reconocen el receptor transmembranal de alta afinidad (FGFR) con el que interactúan para que se induzca la señalización intracelular. Como en otros procesos de señalización de este tipo, la transducción de la señal pasa por la dimerización del FGFR, en la que, de acuerdo con resultados recientes, el glicosaminoglicano participa también, bien induciendo la oligomerización del FGF, bien interactuando directamente con el FGFR en un proceso dependiente de cationes divalentes^{11,12}. (Figura 1.2)

Como se ha comentado, se conocen actualmente más de veinte FGFs y cuatro FGFRs, por lo que resulta difícil establecer unas bases moleculares de la

actividad biológica con carácter general. Además, la naturaleza heterogénea del glicosaminoglicano añade un grado considerable de complejidad. Como se verá posteriormente, incluso trabajos muy recientes sobre la estructura de complejos ternarios FGF-FGFR-oligosacárido aportan datos difíciles de generalizar. Muy probablemente, las diferentes estructuras y las diversas actividades observadas reflejan un complicado proceso combinatorio que implica una diversidad de interacciones específicas entre los tres componentes.

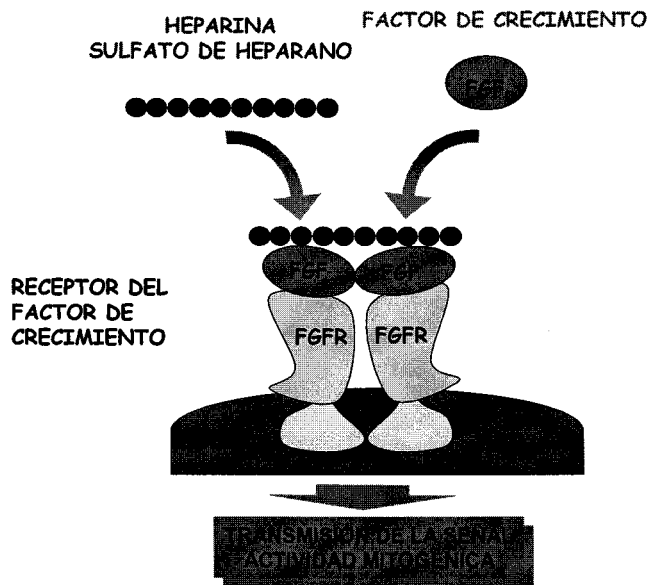


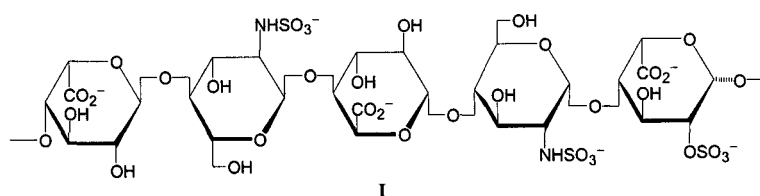
Figura 1.2 Mecanismo de activación mediado por GAG propuesto para los FGF.

En consonancia con esta compleja biosíntesis y como consecuencia de que la casi totalidad de los estudios realizados se han llevado a cabo con los polisacáridos naturales o con oligosacáridos obtenidos por despolimerización química o enzimática de la heparina, los datos existentes sobre la relación estructura-actividad en la activación, ponen de manifiesto la complejidad de definir en términos estructurales el papel de la heparina y del sulfato de heparano en este proceso. No obstante, en los numerosos trabajos realizados con los dos miembros mejor estudiados de la familia de FGFs, el FGF ácido o FGF-1 y el

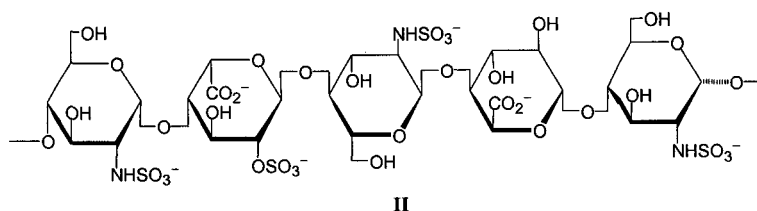
FGF básico o FGF-2, se ha llegado a algunas conclusiones interesantes sobre la relación estructura-reconocimiento y estructura-actividad que se comentan a continuación.

1.1.1.3 Requisitos estructurales mínimos para el reconocimiento molecular y para la inducción de la actividad biológica de FGFs por oligosacáridos de tipo sulfato de heparano

La secuencia oligosacáridica mínima que muestra afinidad hacia el FGF-2 contiene, de acuerdo con detallados análisis bioquímicos, cinco unidades monosacáridicas con grupos *N*-sulfato, un solo residuo de ácido idurónico 2-sulfato y ninguna unidad 6-*O*-sulfatada I^{13,14}.



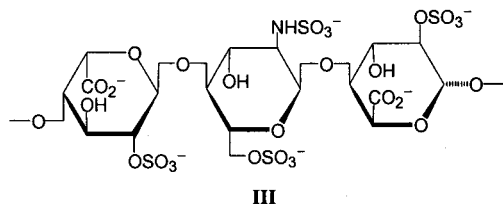
Una secuencia pentasacáridica estrechamente relacionada con la anterior, sin grupos sulfato en 6 y con la unidad IdoA-(2-OSO₃) en una posición diferente (II), se ha propuesto también en un trabajo basado en la estructura cristalina de un complejo entre FGF-2 y un hexámero de tipo heparina¹⁵.



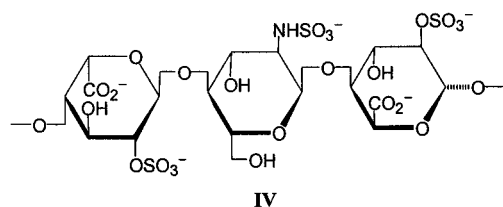
En lo que respecta al FGF-1 se han sugerido igualmente secuencias pentasacáridicas parecidas¹⁶, aunque estudios con heparina parcialmente desulfatada¹⁷ y la estructura de un complejo FGF-1-decasacárido de tipo heparina¹⁸ apuntan, en este caso, la necesidad, además, de grupos 6 sulfato. Este

resultado parece confirmarse por estudios de afinidad de FGF-1 a dominios *NS* de sulfato de heparano¹⁹. La mayor parte de estos estudios aparecen recopilados en la bibliografía²⁰.

En un trabajo reciente²¹, utilizando fragmentos octasacáridicos de sulfato de heparano obtenidos de diversos tejidos, se han perfilado algo mejor y confirmado parte de estos resultados. Todos los octasacáridos con alta afinidad por FGF-1 contienen un motivo trisacárido interno como el de **III**.



Oligosacáridos con mayor grado de sulfatación pero sin este motivo estructural muestran menor afinidad por FGF-1. En cuanto a FGF-2, parece que una estructura hexasacáridica que contenga una unidad IdoA-(2-OSO₃) interna es suficiente para que se produzca interacción aunque los mejores resultados se obtienen con un octámero que contiene la secuencia trisacáridica **IV**.



En lo que respecta a actividad biológica, las cosas son diferentes porque ni el tamaño del oligosacárido ni la secuencia requerida son los mismos que acaban de describirse. En primer lugar, el tamaño de la estructura oligosacáridica necesario tiene que ser invariablemente mayor. Así, se requiere una secuencia por lo menos de doble tamaño que las comentadas en el párrafo anterior para estimular la síntesis de ADN inducida por FGF-2^{22,23}, lo que está de acuerdo con la propuesta de que se debe producir la dimerización o la multimerización del

FGF-2 a lo largo de la cadena del oligosacárido para que tenga lugar la dimerización y la activación del receptor^{7,12,14,24}.

En cuanto al FGF-1 se han propuesto fragmentos hexa-decasacarídicos como tamaño mínimo para promover la fosforilación de FGFR²⁵ y la proliferación celular^{13,26,27}. Esta diferencia entre el tamaño del oligosacárido requerido para interactuar con los FGFs y el necesario para activar el receptor de alta afinidad se ha explicado de dos maneras: 1) admitiendo que se necesitan dos moléculas de FGF orientadas en disposición *cis* a lo largo de la cadena sacarídica para que interactúen con dos FGFRs promoviendo la dimerización^{20,28,29}; 2) admitiendo que el alargamiento de la cadena oligosacarídica es necesario para que, una vez unido el FGF, interactúe con el FGFR poniendo así en contacto al factor de crecimiento con el receptor^{30,31}.

Tampoco en lo que respecta a la secuencia oligosacarídica la situación es la misma para que el oligosacárido presente afinidad o para que induzca actividad biológica. Así, existen datos que indican que no es suficiente la presencia de grupos 2-*O*-sulfato para que se produzca mitogénesis inducida por FGF-2, sino que la observación de esta actividad precisa también de la presencia de grupos 6-*O*-sulfato^{18,19}. Es decir, que la inducción de mitogénesis implica un patrón estructural diferente como consecuencia de que el oligosacárido interactúa también con el receptor^{32,8,33} y estos grupos 6-*O*-sulfato son necesarios para esta última interacción.

En relación con todo lo anterior, es particularmente relevante un trabajo reciente³⁴ donde se demuestra que la angiogénesis inducida por FGF-2 puede modularse usando heparina selectivamente desulfatada. La primera conclusión de este estudio es que el tamaño de la heparina utilizada para activar el FGF-2 es crítica para estimular la actividad tirosina-quinasa del FGFR-1 (el primer receptor de alta afinidad descrito). Este tamaño debe ser, como mínimo, el de un octa- o un deca-sacárido. Los grupos *N*-sulfato y 2-*O*-sulfato son esenciales para que el polisacárido se una al FGF-2 mientras que la estimulación de las

actividades tirosina-quinasa de FGFR-1 requiere también la presencia de grupos 6-*O*-sulfato. La sulfatación de las posiciones 2 y 6 parece ser un prerrequisito para la unión de heparina a un péptido rico en lisinas, que corresponde a la región entre los aminoácidos 160 y 177 en el dominio extracelular del FGFR-1. La heparina selectivamente 6-*O*-desulfatada, que se une al FGF-2 pero no al receptor, hace disminuir la proliferación inducida por FGF-2 en células CHO677, muy probablemente desplazando a la heparina natural. Por último, la angiogénesis inducida por FGF-2, se inhibe si se utiliza heparina 6-*O*-desulfatada.

Todos estos resultados apuntan a que la formación de un complejo ternario FGF-2-heparina-FGFR-1 es esencial para la activación de la actividad tirosina-quinasa del FGFR-1 y la posterior transducción de la señal. Si se impide la formación de este complejo utilizando una heparina modificada pueden regularse algunas de las funciones del FGF-2 como la inducción de la angiogénesis.

1.1.1.4 Estructura tridimensional de complejos FGF-carbohidrato y FGF-carbohidrato-FGFR

Por todo lo anterior, parece evidente que, en el momento actual, los estudios sobre la determinación de la estructura de los complejos ternarios FGF-oligosacárido-FGFR están en condiciones de proporcionar una información muy valiosa para entender el proceso biológico en su integridad. Durante los últimos años, en efecto, han aparecido las primeras publicaciones aportando datos cristalográficos de rayos X de alta resolución sobre algunos de estos complejos^{35,36} que van a comentarse a continuación con cierto detalle.

En dos artículos publicados en los últimos años de la pasada década se han determinado las estructuras de complejos entre FGF-1 y FGF-2 y oligosacáridos de tipo heparina^{37,38}. De estos resultados es particularmente interesante en el contexto de la presente Tesis Doctoral, el análisis del complejo de dímeros de FGF-1 con un decámero de tipo heparina que muestra una

estructura de *sándwich* en la que dos moléculas de FGF-1 interaccionan simultáneamente con caras opuestas del oligosacárido (Figura 1.3).

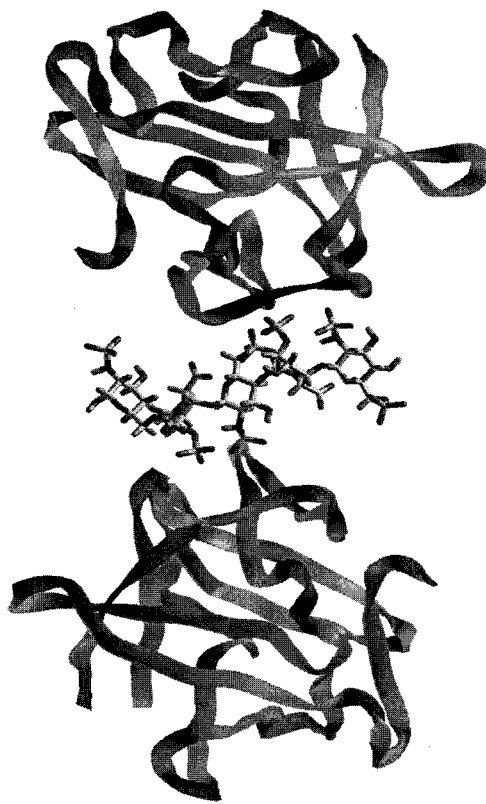


Figura 1.3 Estructura dimérica del complejo *trans* de FGF-1 con un deca-sacárido de heparina, obtenida por rayos X por DiGabriele et al. y recogida en el Protein Data Bank (1AXM.pdb)

Estas interacciones implican a cuatro o cinco unidades monosacáridicas pero existe una importante variabilidad en el sentido de que el oligosacárido puede ocupar diferentes posiciones desplazadas alrededor de una unidad disacáridica o, incluso, unirse con polaridad invertida. Sobre estos resultados se ha propuesto un modelo, apoyado por experimentos de mutagénesis³⁸, en el que los residuos de FGF que son importantes en la interacción con FGFR se han mapeado en la superficie del complejo FGF-1-oligosacárido-FGF-1. De acuerdo

con este modelo, el oligosacárido promovería la dimerización del receptor uniéndose a diferentes dominios de dos moléculas de receptor diferentes.

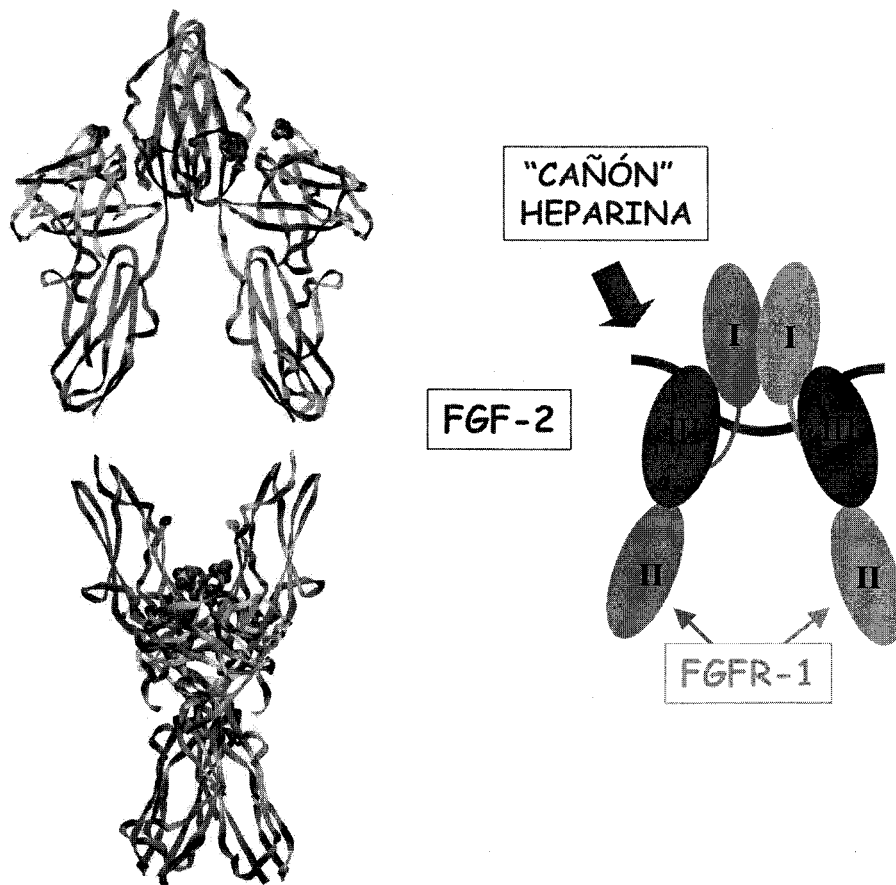


Figura 1.4 Representación de la estructura de difracción de rayos X del dímero de FGF-2 (amarillo) y FGFR-1 (azul y naranja), propuesto por Plotnikov et al. (1CVS.pdb). Arriba, vista lateral del dímero. Abajo, giro de 90° de la representación superior. A la derecha representación simplificada del complejo, vista lateral.

Este modelo implica que no existe interacción FGF-1-FGF-1 ni interacción oligosacárido-FGFR y es muy diferente del que se ha inferido de un estudio cristalográfico posterior basado en datos cristalográficos de un complejo

FGF-2-FGFR-1³⁹. En efecto, según los datos cristalográficos de este estudio³³, se forman dímeros FGF-2-FGFR-1 en los que cada molécula de FGF interactúa con dos dominios diferentes de una molécula de receptor y con un dominio de otra molécula de receptor en el complejo contiguo. Este dímero se estabiliza por interacción directa entre dominios de cada molécula de receptor. El modelo construido a partir de estos datos propone que una cadena oligosacáridica, con un tamaño óptimo de doce unidades que se sitúa en un *cañón* de carga positiva (denominado cañón de heparina) entre dos dominios de dos moléculas distintas del receptor que se extiende a lo largo de las moléculas de FGF (**Figura 1.4**). Este modelo sí está de acuerdo con resultados anteriores sobre el tamaño del oligosacárido y la existencia de interacción oligosacárido-FGFR.

Sin embargo, ni este último modelo³³ ni el anterior¹⁴, se ajustan bien a los resultados de los estudios cristalográficos publicados inmediatamente después sobre los complejos ternarios. El primero de estos estudios se refiere a la estructura de un complejo 2:2:2 entre FGF-2, FGFR-1 y un decaacárido de tipo heparina resuelta a una resolución de 3 Å⁴⁰. En este caso, en cada unidad 1:1 FGF-FGFR del complejo el oligosacárido hace numerosos contactos, tanto con el FGF como con el FGFR, estabilizando la interacción entre ambos, y con el FGFR de la unidad 1:1 FGF-FGFR adyacente. Con estos resultados y datos bioquímicos puede construirse un modelo en el que el decaacárido interactúa a través de su terminal no reductor con el FGF-2 y el FGFR-1 formándose un complejo estable 1:1:1 entre FGF, FGFR y oligosacárido. Este complejo se puede combinar con otro complejo 1:1:1 a través de contactos directos FGFR-FGFR, interacciones secundarias entre la molécula de FGF-2 en un complejo ternario y una molécula de FGFR-1 en el complejo ternario adyacente y contactos indirectos FGFR-FGFR mediados por el decaacárido (**Figura 1.5a**).

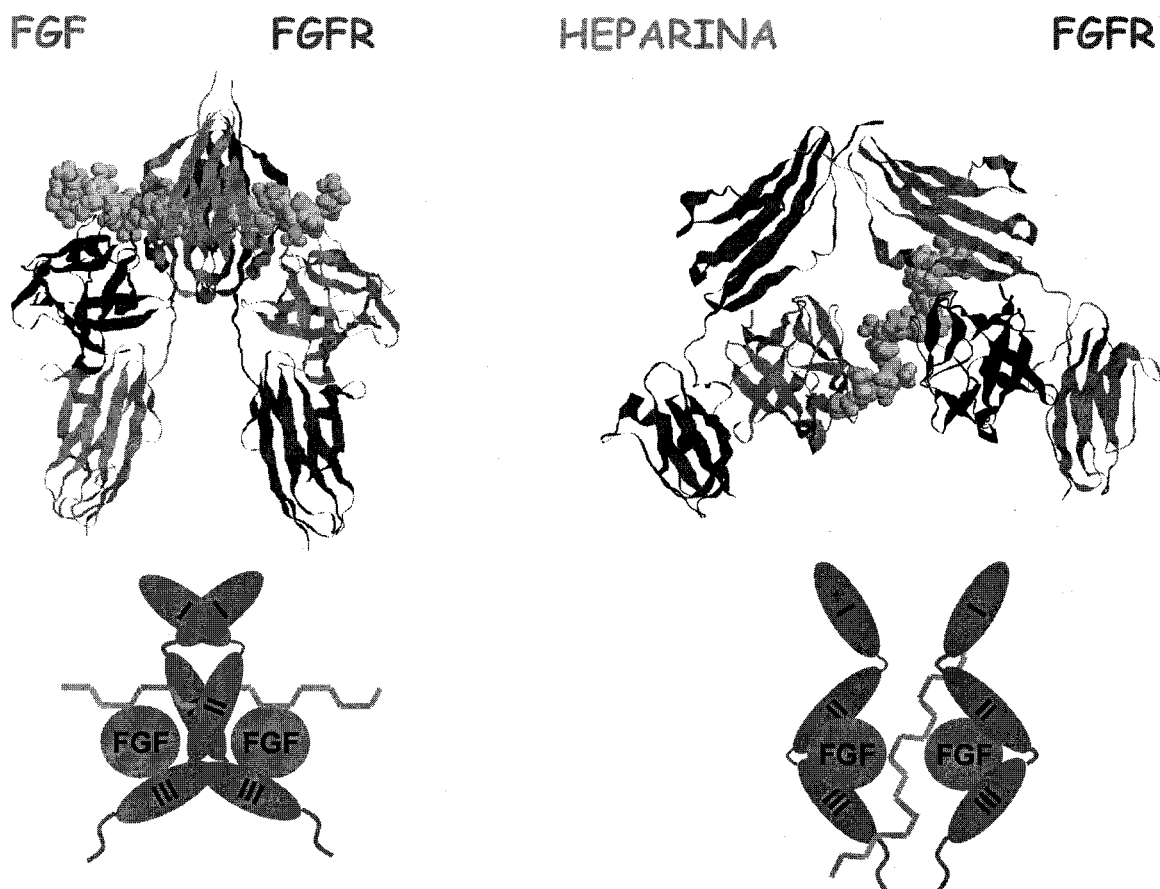


Figura 1.5 En la parte izquierda aparece el complejo ternario propuesto por Schlessinger et al., de estequiometría 2:2:2; Abajo una representación esquemática del mismo. En la parte derecha aparece el complejo ternario propuesto por Pellegrini et al., de estequiometría 2:2:1; Abajo representación esquemática del mismo. (Azul y celeste: FGF; rojo y verde: FGFR; amarillo: heparina).

El segundo estudio, da cuenta de la estructura cristalina de un complejo 2:2:1 entre FGF-1, FGFR-2 y un dodecasacárido de tipo heparina resuelta a una resolución de 2.8 Å. El complejo se ensambla alrededor de la molécula del dodecasacárido que une dos moléculas de FGF-1 para formar un dímero de estructura similar a la propuesta previamente³⁸. Este complejo 2:1 FGF-

dodecasacárido actúa como un puente entre las dos moléculas de FGFR-2. En este caso el papel del oligosacárido en la dimerización del receptor es crítico ya que existen muy pocas interacciones proteína-proteína entre las dos mitades del complejo pentamérico (**Figura 1.5b**).

Existen, por tanto, importantes diferencias en las dos estructuras de complejos ternarios determinadas hasta ahora, lo que puede indicar que miembros diferentes de la familia de los FGF y sus receptores respectivos pueden interactuar de formas diferentes con el sulfato de heparano. Estas diferencias pueden ser consecuencia de diferencias en la distribución y la estructura del sulfato de heparano y de los receptores de alta afinidad en la superficie celular de tejidos diferentes. En lo que respecta al oligosacárido, debe enfatizarse que los estudios cristalográficos mencionados se han llevado a cabo con oligosacáridos obtenidos por despolimerización de la heparina de estructura no totalmente definida y, en todo caso, diferente de las secuencias de sulfato de heparano que deben actuar *in vivo*. No parece aventurado afirmar que variaciones en la secuencia sacarídica o en el patrón de sulfatación pueden tener consecuencias importantes en el proceso biológico permitiendo o impidiendo el ensamblaje del complejo apropiado de moléculas para que se inicie la transducción de la señal biológica.

El conocimiento de las consecuencias estructurales y biológicas de esta diversidad de posibilidades pasa disponer de oligosacáridos homogéneos y puros, de estructura perfectamente definida, que permitan abordar el problema con garantía utilizando aproximaciones estructurales y bioquímicas. Estos oligosacáridos de estructuras perfectamente definidas tienen que obtenerse actualmente por síntesis química. En el apartado siguiente se comenta el estado actual de la síntesis de oligosacáridos de tipo heparina-sulfato de heparano.

1.2 RESULTADOS DE NUESTRO LABORATORIO

Los trabajos experimentales de esta tesis doctoral comienzan prácticamente con la preparación de los primeros modelos sintéticos de heparina regular y han continuado paralelamente al diseño y preparación de otras series de modelos para el estudio de la interacción sulfato de heparano – FGF. Los avances en el conocimiento de la estructura de los primeros compuestos sintéticos conseguidos en esta tesis doctoral, han sido empleados en el diseño de las siguientes generaciones de modelos.

1.2.1 OLIGOSACÁRIDOS MODELOS DE LA REGIÓN REGULAR DE HEPARINA

Como se ha comentado en el apartado 1.2 existía, en el momento de comenzar este proyecto de investigación, una confusión en cuanto a los requerimientos mínimos necesarios para que un GAGs fuera capaz de activar un factor de crecimiento para fibroblastos. Gran parte de esta confusión se origina en las limitaciones de pureza y homogeneidad química de los modelos de GAG empleados para estudiar actividades o propiedades de asociación con FGFs. Por ello el primer objetivo fueron un hexasacárido y un octasacárido modelos sintéticos de la región regular de heparina, el GAG sobre el que existía consenso en cuanto a su capacidad de activar FGFs.^{41,42}

1.2.2 OLIGOSACÁRIDOS SIN SIMETRÍA HELICOIDAL

Uno de los mecanismos propuestos para la activación de FGF suponía la dimerización *trans* a través de una molécula de sulfato de heparano. Este mecanismo se fundamentaba esencialmente en los resultados de cristalografía del complejo entre un decaacárido y FGF2 mencionados anteriormente (**figura 1.4**). Explicaba elegantemente otros experimentos que caracterizaron la dimerización así como la ausencia de grandes cambios conformacionales de los FGFs al formarse el complejo al proponer como especie activa no un nuevo conformero de FGF sino el propio dímero para cuya formación era esencial la participación

de una molécula de GAG. Basándose en estos resultados y a la luz de los resultados estructurales sobre los modelos de heparina anteriores que indicaban que se mantenía una estructura helicoidal como la de la heparina natural y que se comentarán en esta tesis, se diseñaron y sintetizaron dos nuevos oligosacáridos que no fueran capaces de inducir la dimerización del FGF.^{43,44} Para estos compuestos se eligió una distribución tal de los grupos sulfato que, de mantenerse la misma geometría del esqueleto, los grupos sulfato se dirigirían hacia la misma cara de la molécula como se representa en la figura 1.6.

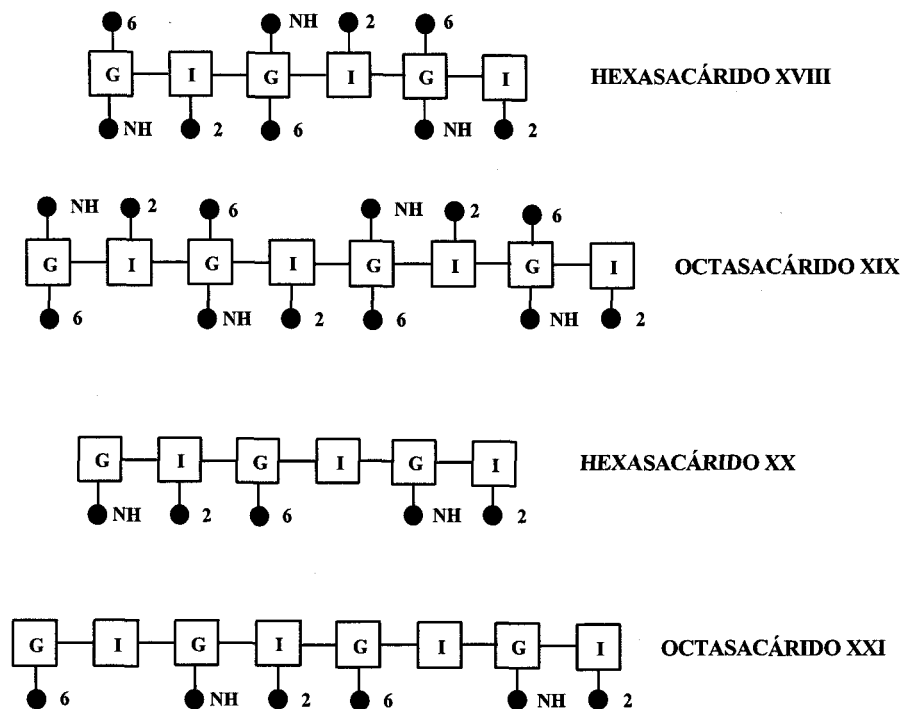


Figura 1.6 Representación simplificada de los oligosacáridos indicando la orientación de los grupos sulfato en la estructura helicoidal.

1.2.3 OLIGOSACÁRIDOS MODELOS DE SULFATO DE HEPARANO

De los resultados de actividad biológica de los modelos sintéticos, que se comentarán en el siguiente apartado, se deduce que la distribución de cargas particular de un GAGs es esencial a la hora de activar al FGF. Por otro lado como se ha indicado anteriormente, de las estructuras activas mínimas propuestas para FGF-1 y FGF-2, se puede inferir una cierta selectividad dependiente de la sustitución en las posiciones 2 de iduronato, activo para el FGF-2 o 6 de glucosamina, para el FGF-1. Esencialmente debido a estos motivos se diseñaron y sintetizaron dos hexasacáridos que carecían de los grupos sulfato 2-idurónico o 6-glucosamina. Estos compuestos tienen un el mismo número de grupos cargados que el modelo sin simetría helicoidal pero con una distribución similar a la de los modelos regulares (figura 1.7).

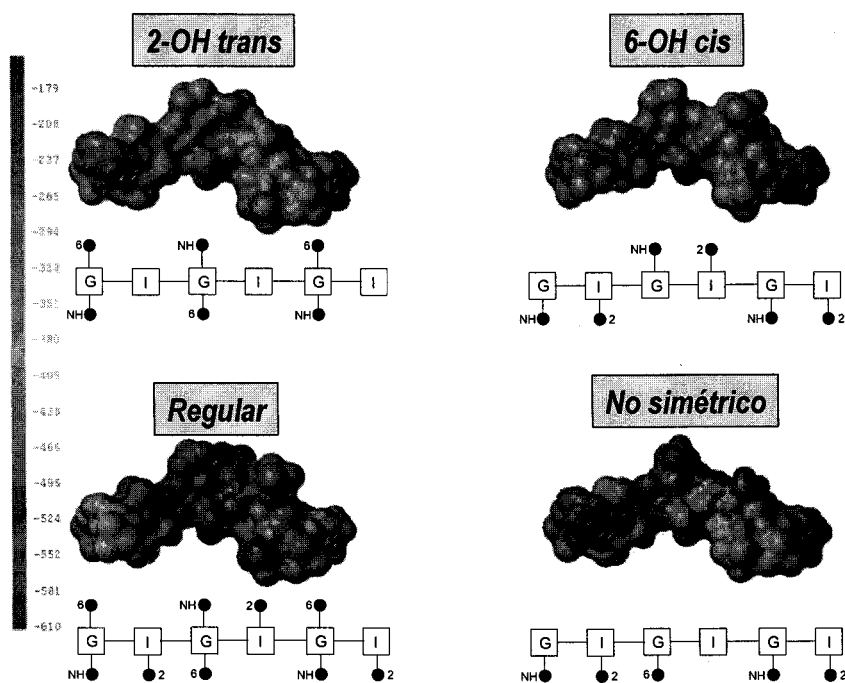


Figura 1.7 *Representación simplificada de los cuatro tipos de oligosacáridos indicando la orientación de los grupos sulfato en la estructura helicoidal.*

1.2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS OLIGOSACÁRIDOS SINTÉTICOS

La medida de la actividad biológica se realizó en colaboración con el laboratorio del Profesor Jiménez Gallego del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) y consistieron en la medida de la inducción de actividad mitogénica en relación a la provocada por la heparina natural (**figura 1.8**). En primer lugar se determinó que los modelos de la región regular son capaces de inducir actividad, pero que mientras que el octasacárido alcanza un máximo similar al de la heparina el hexasacárido es mucho menos activo. Este resultado estaba de acuerdo con la existencia de una longitud mínima del GAG para ser activo, aun cuando definía cual. Los resultados de los productos sin simetría fueron sorprendentes. Cuando se esperaba una actividad nula, de operar el modelo de la dimerización mediada por el GAG, o similar a los homólogos regulares en el caso contrario, se observó una actividad muy superior en el caso del hexasacárido.

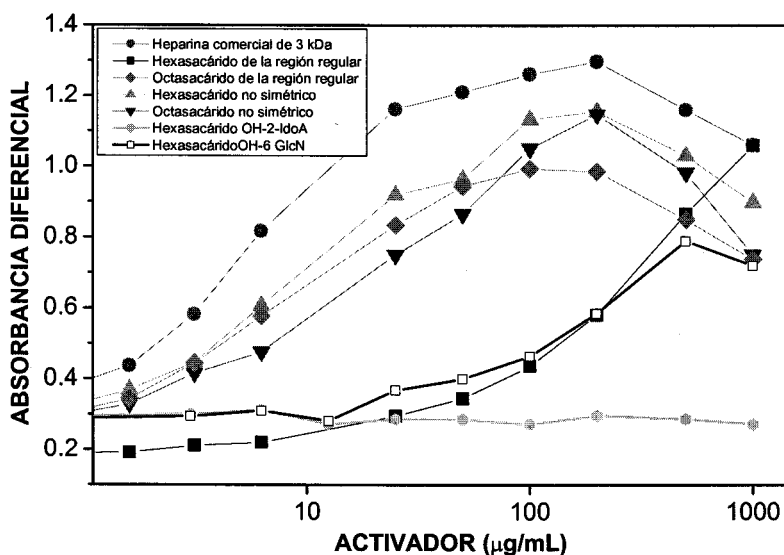


Figura 1.8 Capacidad de inducción de mitogénesis de los oligosacáridos sintéticos comparada con la heparina natural. Los experimentos se realizaron exponiendo a concentraciones crecientes de inductor a cultivo de células tratadas para eliminar el sulfato de heparano natural en presencia de una unidad mitogénica de FGF-1 y midiendo la absorbancia de los núcleos teñidos para el recuento de células.

1.3 OBJETIVOS

Dentro del contexto del proyecto general es necesario conocer con la mayor precisión posible la estructura tridimensional de los modelos para poder comprender sus actividades y eventualmente comprender las bases de su actividad. En este sentido se asume que las moléculas participantes en un proceso de reconocimiento moléculas de este tipo llevan implícita en su estructura tridimensional toda la información necesaria para llevar a cabo su función. De esta manera, si la heterogeneidad en la estructura química de los glicosaminoglicanos es responsable de fenómenos de selectividad y regulación de

procesos de señalización celular, esta debe tener un reflejo en la estructura de los GAGs en función de su estructura química concreta. Por ello los objetivos de esta tesis se estructuran en dos vertientes. En primer lugar describir con la mayor precisión posible la estructura de los oligosacáridos mencionados y relacionarla con su actividad biológica. Por otro, comenzar un estudio comparativo de la biblioteca estructural que suponen estas series de compuestos.

Dentro de la aproximación general del grupo, se pretende preparar modelos sintéticos de GAG con diferentes patrones de sustitución para emplearlos como herramientas con las que conocer los factores que regulan la actividad de los FGFs. En todos los casos, durante el diseño se ha supuesto que la estructura tridimensional de estos compuestos era similar a la de la heparina natural, una hélice. Sin embargo, en algunos casos, como en el caso de los compuestos sin simetría helicoidal, las modificaciones fueron drásticas y se podría suponer que con el objeto de aliviar repulsiones electrostáticas se destruyera la geometría deseada. En otros, aunque no era tan probable, no se sabía con exactitud el impacto que podría tener el acortar la cadena sacarídica, como en el caso de los modelos de heparina regular donde el octámero es activo y el hexámero no.

Aunque los objetivos concretos se comentan más adecuadamente en la introducción del capítulo correspondiente la idea general se expone a continuación. Mediante RMN se obtendrían datos experimentales de la estructura de estos compuestos en disolución: constantes de acoplamiento y NOE. A partir de estos observables se intentaría obtener información geométrica que definiera la estructura del compuesto estudiado. Considerando la estructura desde un punto de vista amplio en ella se deben incluir también aspectos de su dinámica. Para ello, además del tratamiento de los datos homonucleares se puede emplear estudiar la espectroscopía de relajación de spin de los pares CH del carbohidrato. De esa manera se obtiene información acerca de su forma global y de su flexibilidad en la escala de tiempos de nano y picosegundo. Estos datos se interpretan apoyándose en simulaciones de dinámica molecular.

En el caso del modelado molecular, necesario para la interpretación de los datos experimentales era además necesario realizar una investigación metodológica previa ya que no existían antecedentes satisfactorios de simulaciones de dinámica molecular en este tipo de compuestos. La principal dificultad que presenta la simulación computacional de estos compuestos es la de su alta carga electrostática. Aunque la simulación otros biopolímeros cargados como los ácidos nucleicos está razonablemente resuelta, implica el empleo de métodos muy complejos y con un alto coste computacional y en este caso la densidad de carga es mucho mayor. Adicionalmente, el número de parametrizaciones de grupos sulfato adecuadas es escaso y es necesario implementarlos en un campo de fuerzas adecuado para carbohidratos. Finalmente, como se comentará mas profundamente en la introducción del capítulo 3, para simular los GAG es necesario modelar un comportamiento inusual como es un equilibrio conformacional característico de los anillos de iduronato con las dificultades que esto presenta, especialmente en cuanto a la escala de tiempos en la que transcurre.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1 K. G. Bowman, C. R. Bertozzi; *Chem Biol.* **1999**, *6*, R9-R22
- 2 B. Casu, U. Lindahl, *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2001**, *57*, 159-206.
- 3 U. Lindahl, *Glycocon.J.* **2000**, *17*, 597-605
- 4 J. Turnbull, A. Powell, S. Guimond, *TRENDS Cell Biol.* **2001**, *11*, 75-82
- 5 T. Nishimura, Y. Nakatake, M. Konishi, N. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1492*, 203-206
- 6 U. Lindahl, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 597-605.
- 7 P. Clint, L. Claesson-Welsh, *Front. Biosci.* **1999**, *4*, 165.
- 8 B. Casu, U. Lindahl, *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2001**, *57*, 159-206.
- 9 H. E. Conrad, Heparin binding proteins, Academic Press, San Diego, **1998**.
- 10 I. Capila, R. J. Linhardt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 390-412.
- 11 T. Spivak-Kroizman, M. A. Lemmon, J. Dikic, J. E. Ladbury, D. Pinchasi, J. Huang, M. Jaye, G. Crumley, J. Schlessinger, I. Lax, *Cell*, **1994**, *79*, 1015-1024.
- 12 M. Kan, F. Wang, J. Xu, J. W. Crabb, J. Hou, W. L. McKeehan, *Science* **1993**, *259*, 1918-1921.
- 13 M. Ishihara, D. J. Tyrrell, G. B. Stauber, S. Brown, L. S. Cousens, R. J. Stack, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4675-4683.
- 14 M. Maccarana, B. Casu, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23898-23905.
- 15 S. Faham, R. E. Hileman, J. R. Fromm, R. J. Lindhart, D. C. Rees, *Science* **1996**, *271*, 1116-1120.
- 16 H. Mach, D. B. Volkin, C. J. Burke, C. R. Middaugh, R. J. Lindhardt, J. R. Fomm, D. Longanathan, L. Mattson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5480-5489.
- 17 M. Ishihara, *Glycobiology* **1994**, *4*, 817-824.
- 18 A. D. DiGabrielle, I. Lax, D. I. Chen, C. M. Swahn, M. Jaye, J. Schlessinger, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, *393*, 812-817.
- 19 J. Kreuger, K. Prydz, R. F. Pettersson, U. Lindahl, M. Salmivirta, *Glycobiology* **1994**, *4*, 817-824.

-
- 20 G. Waksman, A. B. Herr, *Nature Struct. Biol.* **1998**, *5*, 527-530.
- 21 J. Kreuger, M. Salmivirta, L. Sturiale, G. Giménez-Gallego, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30744-30752.
- 22 S. Guimond, M. Maccarana, B. B. Olwin, U. Lindahl, A. C. Rapraeger, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23906-23914.
- 23 D. A. Pye, R. R. Vives, J. E. Turnbull, P. Hyde, J. T. Gallagher, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22936-22932.
- 24 F. J. Moy, M. Safran, A. P. Seddon, D. Kitchen, P. Bohlen, D. Aviezer, A. Yayon, R. Powers, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4782-4791.
- 25 D. M. Ornitz, A. Yayon, J. G. Flanagan, C. V. Svahn, E. Levi, P. Leder, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 240-247.
- 26 A. G. Gambarini, C. A. Miyamoto, G. A. Lima, H. B. Nader, K. Dietrich, *Mol. Cell. Biochem.* **1993**, *124*, 121-129.
- 27 F. Y. Zhou, M. Kahn, R. T. Owens, W. L. McKeegan, I. A. Thompson, R. J. Lindhardt, M. Höök, *Eur. J. Cell. Biol.* **1997**, *73*, 71-80.
- 28 J. Schlesinger, I. Lax, M. Lemmon, *Cell* **1995**, *83*, 357-360.
- 29 G. Venkataraman, V. Sasisekharan, A. B. Herr, D. M. Ornitz, G. Waksman, C. L. Cooney, R. Langer, R. Sasisekharan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 845-850.
- 30 M. Kan, F. Wang, B. To, J. L. Gabriel, W. L. McKeegan, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26143-26148.
- 31 M. W. Pantoliano, R. A. Horlick, B. A. Springer, D. E. van Dick, T. Tobery, D. R. Wetmore, J. D. Lear, A. T. Nahapetian, J. D. Bradley, W. P. Sisk, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10229-10248.
- 32 L. Kinsella, H. L. Chen, J. A. Smith, P. S. Rudland, D. G. Fernig, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 419-422.
- 33 G. Gao, M. Goldfarb, *EMBO J.* **1995**, *14*, 2183-2190.
- 34 L. Lundin, H. Larsson, J. Kreuger, S. Kanda, U. Lindahl, M. Salmivirta, L. Claesson-Welsh, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 24653-24660.

-
- 35 J. Schlessinger, A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahimi, A. V. Elisenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Lindhardt, M. Muhammadi, *Mol. Cell.* **2000**, 6, 743-750.
- 36 L. Pellegrini, D. F. Burke, F. von Delft, B. Molloy, T. L. Blundell, *Nature* **2000**, 407, 1029-1034.
- 37 S. Faham, R. E. Hileman, J. R. Fromm, R. J. Lindhart, D. C. Rees, *Science* **1996**, 271, 1116-1120.
- 38 A. D. DiGabrielle, I. Lax, D. I. Chen, C. M. Swahn, M. Jaye, J. Schlessinger, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, 393, 812-817.
- 39 L. Pellegrini, D. F. Burke, F. von Delft, B. Molloy, T. L. Blundell, *Nature* **2000**, 407, 1029-1034.
- 40 J. Schlessinger, A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahimi, A. V. Elisenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Lindhardt, M. Muhammadi, *Mol. Cell.* **2000**, 6, 743-750
- 41 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, 673-685.
- 42 J. L. de Paz, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **2000**.
- 43 R. Ojeda, J. Angulo, P. M. Nieto, M. Martín-Lomas, *Can. J. Chem.* **2002**, 80, 8, 917-936.
- 44 R. Ojeda, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, **2001**.

CAPITULO 2

ESTRUCTURA Y DINÁMICA POR RMN

2.1 INTRODUCCIÓN. RMN PARA LA DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE OLIGOSACÁRIDOS.

La aplicación de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear a los carbohidratos ha seguido durante los últimos años un desarrollo creciente que se ha traducido en la aparición de varias revisiones generales en revistas internacionales^{1,2,3,4,5,6}.

A pesar de sus tamaños relativamente pequeños, comparados con otras biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, los oligosacáridos producen generalmente espectros de RMN marcadamente complejos. La principal razón es la escasa dispersión espectral que presentan en general los protones de los anillos, lo que se traduce en un importante solapamiento de las señales así como una considerable probabilidad de que se den situaciones de “acoplamiento fuerte”. De esta forma, las estrategias de asignación de resonancias pueden diferir de las que se emplean en otras biomoléculas, aunque las técnicas empleadas sean las mismas⁷.

Las estrategias de espectroscopía de RMN empleadas en oligosacáridos difieren aún más de aquellas aplicadas a proteínas y ácidos nucleicos cuando se trata de estudiar la estructura tridimensional de las biomoléculas. Para estas últimas, se ha puesto ampliamente de manifiesto que las medidas de NOE junto con medidas de constantes de acoplamiento, pueden originar estructuras promedio en disolución que son razonablemente comparables a las estructuras derivadas de estudios de difracción de rayos-X. El éxito de esta metodología se debe fundamentalmente al elevado número de restricciones experimentales de distancias (especialmente restricciones de “largo” alcance) y ángulos de torsión que se obtienen para este tipo de biomoléculas. Estas restricciones pueden ser analizadas haciendo uso de algoritmos de matrices de distancias en el espacio cartesiano o en el espacio de ángulos diedros, lo que origina una estructura promedio en disolución compatible con los datos experimentales que,

posteriormente, podría ser refinada mediante minimización energética y dinámica molecular, haciendo uso de un campo de fuerzas apropiado.

Sin embargo, dicha aproximación no ha tenido un desarrollo paralelo en estudios estructurales de oligosacáridos debido, fundamentalmente, a que el número de restricciones de distancias que se derivan de las medidas de NOE es considerablemente inferior al que se obtiene para proteínas y ácidos nucleicos. De hecho, muy a menudo, sólo se dispone de uno o dos NOEs interresiduales significativos, a través de los enlaces glicosídicos. Además, generalmente no se observan NOEs a medio y/o largo alcance entre zonas distantes de la biomolécula, que son los que mayor restricción estructural imponen, ya que los oligosacáridos suelen presentar una estructura extendida, es decir, suelen carecer de estructura terciaria.

2.1.1 EXPERIMENTOS PARA LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE OLIGOSACÁRIDOS.

Los residuos monosacarídicos que constituyen un oligosacárido determinado presentan, en disolución de $^2\text{H}_2\text{O}$, siete señales (en general para hexopiranosas) o cinco señales (para ácidos urónicos) correspondientes a los protones no intercambiables. Como se ha mencionado, la principal complejidad presente en los espectros monodimensionales ^1H -RMN de oligosacáridos surge como consecuencia de la escasa dispersión espectral de dichos protones. Sin embargo, los protones H1 (anoméricos) constituyen una excepción, ya que su resonancia se localiza siempre a campo bajo respecto a los restantes núcleos como consecuencia del efecto de retirada de electrones de los dos oxígenos unidos a él (O5 y O glicosídico). Para aquellas señales localizadas fuera de la región de solapamiento (3 – 4 ppm), Vliegthart et al.⁸ introdujeron la denominación de “grupo-informador-estructural” (structural-reporter-group), o “huella dactilar”, ya que los desplazamientos químicos de dichas señales dependen fuertemente de la estructura del carbohidrato. Mediante esta aproximación se pueden identificar azúcares individuales o secuencias de

residuos, así como motivos estructurales o azúcares específicos y composiciones de enlaces glicosídicos por comparación con bases de datos adecuadas.^{9,10,11}

Por lo tanto, para oligosacáridos, las asignaciones de resonancias en protón comienzan con los protones anoméricos, generalmente bien resueltos. Además, la integración de las resonancias anoméricas ofrece una estimación inicial del número de residuos monosacáridicos diferentes que están presentes. Sin embargo, la determinación de los monosacáridos constituyentes, sus configuraciones anoméricas, tipos de enlaces glicosídicos, determinación de la secuencia de residuos, así como la posición de los grupos sustituyentes, requiere de una variedad de métodos multidimensionales de RMN.

En principio, con el experimento de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY¹², es posible llevar a cabo una asignación secuencial por pasos a lo largo de un anillo comenzando con el protón anomérico de cada residuo, produciéndose la transferencia de coherencia solamente entre aquellos núcleos que se encuentran directamente acoplados a través de enlaces covalentes. En casos donde la resolución es un problema se suele hacer uso de la variante de dicho experimento con un filtro cuántico doble, DQF-COSY^{13,14,15}. Éste presenta una mejor resolución, que permite la observación de picos de cruce próximos a la diagonal, debido a la diferencia en las formas de líneas de las señales de dicha diagonal, predominantemente en modo absorción y antifase, a diferencia del COSY, donde éstas aparecen en modo dispersivo y en fase. Aún así, a pesar de la introducción de la segunda dimensión de frecuencias, los efectos de la escasa dispersión espectral y del acoplamiento fuerte pueden estar presentes en los espectros COSY, por lo que normalmente es difícil obtener asignaciones completas de resonancias con sólo este tipo de experimento.

Gran cantidad de información para llevar a cabo la asignación espectral se obtiene mediante el uso de la espectroscopía de correlación total, TOCSY¹⁶, o espectroscopía Hartmann-Hahn homonuclear, HOHAHA^{17,18}, donde la transferencia de coherencia se propaga entre todos los protones dentro del mismo

anillo monosacárido (sistema de espines), si el tiempo de mezcla es adecuado, aún cuando no exista acoplamiento directo entre todos ellos. Aunque el aumento en el número de picos de cruce pueda parecer agravar el problema de la asignación, las señales de los protones de un determinado anillo monosacárido pueden ser asignadas a lo largo de la coordenada ω_2 de la resonancia aislada del protón anomérico, inspeccionando la multiplicidad característica de cada núcleo. Esta multiplicidad es esencialmente constante debido a la geometría habitualmente fijada de los anillos de piranosa.

En este punto generalmente conocemos, al menos, el número de sistemas de espines presentes en el oligosacárido, así como las asignaciones de los protones que pertenecen a cada uno de ellos, pero puede que no podamos adscribir cada sistema de espines a un residuo monosacárido concreto. Este paso se lleva a cabo mediante el uso del experimento NOESY, que correlaciona aquellos núcleos que están suficientemente próximos en el espacio. Las conectividades establecidas por los NOEs que tienen verdadero valor en asignación son aquellas que correlacionan núcleos pertenecientes a diferentes residuos, ya que nos permiten establecer la correlación a lo largo de toda la cadena oligosacárida, y asignar cada sistema de espines a un determinado residuo.

Los valores de los desplazamientos químicos de ^{13}C se pueden obtener fácilmente mediante los experimentos de correlación heteronuclear con detección inversa ^{13}C - ^1H HMQC ó ^{13}C - ^1H HSQC. De esta forma, la asignación de ^{13}C se ve facilitada por la gran dispersión existente en el experimento bidimensional. Cuando el tamaño del oligosacárido empieza a ser considerable es aconsejable el uso del experimento HSQC, en lugar del HMQC, ya que proporciona señales más finas en la dimensión del heteronúcleo.

Finalmente, es importante mencionar que no se puede definir de forma unívoca un simple "protocolo general de asignación" para oligosacáridos, ya que

la naturaleza exacta de los sistemas de espín dentro de cada monosacárido depende considerablemente de la estructura.

2.1.2 CONFORMACIONES ANULARES DE HEXOPIRANOSAS POR RMN. CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO VECINALES ${}^3J_{H,H}$

Los parámetros de RMN han sido ampliamente utilizados en la determinación de las conformaciones de los anillos de azúcar en mono-, oligo-, y polisacáridos. Lemieux et al.¹⁹ fueron los primeros en observar que protones orientados ecuatorialmente aparecen a campo más bajo comparados con aquellos químicamente equivalentes pero orientados axialmente. Ellos determinaron también que la constante de acoplamiento vecinal entre protones en orientación axial-axial es aproximadamente entre dos y tres veces mayor que en el caso de orientaciones axial-ecuatorial, o ecuatorial-axial.

Es un hecho conocido que el valor de la constante de acoplamiento entre dos núcleos depende tanto del número y tipo de enlaces a través de los cuales están acoplados, como de la geometría de la "ruta" de acoplamiento que definen dichos enlaces. Esto hace que las constantes de acoplamiento se utilicen para obtener información acerca de la estereoquímica de la molécula. Concretamente, las constantes de acoplamiento vecinales (a tres enlaces) ${}^3J_{H,H}$ proporcionan información acerca del ángulo diedro subtendido por los átomos acoplados. La ecuación más ampliamente utilizada es la propuesta por Karplus²⁰:

$${}^3J_{H,H} = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C \quad \text{Ec. 2.1.1}$$

donde θ es el ángulo diedro, y los parámetros A, B, y C, deben ser ajustados.

La ecuación 2.1.1, sin embargo, no tiene en cuenta el hecho de que las constantes de acoplamiento vecinales dependen considerablemente de las electronegatividades de los sustituyentes enlazados²¹. Así, dicha ecuación ha sido

convenientemente modificada²² para considerar las orientaciones de los grupos electronegativos unidos al fragmento H-C-C-H:

$${}^3J_{H,H} = P_1 \cos^2 \phi + P_2 \cos \phi + P_3 + \sum_i \Delta\chi_i \{P_4 + P_5 \cos^2(\xi_i \cdot \phi + P_6 \cdot |\Delta\chi_i|)\} \quad \text{Ec. 2.1.2}$$

donde ϕ es el ángulo diedro, los parámetros P_1 - P_6 se ajustaron empíricamente, $\Delta\chi$ tiene en cuenta la diferencia de electronegatividad del sustituyente respecto al hidrógeno, y ξ toma valores +1, o -1, dependiendo de la orientación relativa de dicho sustituyente (se definen sustituyentes “positivos”, y “negativos”)²².

Rao et al.²³ han aplicado dicha ecuación para un determinado número de azúcares en la conformación 4C_1 , y realizaron una comparación con los datos experimentales. El acuerdo es bastante bueno en general, pero además, la aplicación de dicha ecuación dió resultados acordes con las reglas empíricas de Lemieux, es decir, que se distinguen dos grupos, uno en la región de 1 a 5 Hz (axial/ecuatorial y ecuatorial/axial), y otro en la región de 7 a 11 Hz (axial/axial). Por otro lado, de mayor interés resultó la capacidad predictiva de los efectos orientacionales de los grupos electronegativos sobre las constantes de acoplamiento. Así, por ejemplo, dicha ecuación predice adecuadamente la diferencia entre las constantes de acoplamiento ${}^3J_{H4,H5}$ en α -D-galactopiranosidos (1.0 Hz) y ${}^3J_{H4,H5e}$ en α -D-xilopiranosidos (5.1 Hz) (figura 2.1.1), diferencia que no es explicable por una variación importante en los ángulos diedros, ya que en ambos casos la disposición relativa de ambos es *gauche*. En este caso concreto dicha variación es debida a la diferente orientación de los átomos O4 y O5 en el α -D-galactopiranosido (*gauche*), y en el α -D-xilopiranosido (*trans*).

Estos resultados indican que la observación de diferencias importantes en las constantes de acoplamiento entre distintos residuos de azúcar no necesariamente deben ser asignadas a distorsiones en la conformación anular,

sino que podrían deberse exclusivamente a las diferencias en la orientación relativa de los grupos electronegativos.

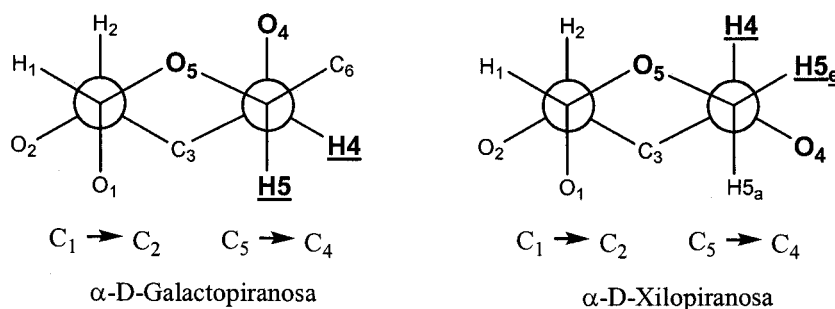


Figura 2.1.1 Proyecciones de Newman de galacto- y xilopiranosas.

El empleo de ecuaciones tipo Karplus (**Ec. 2.1.1** y **Ec. 2.1.2**), sin embargo, no está exento de una serie de problemas que deben ser considerados a la hora de emprender un análisis conformacional que se apoye en valores de constantes de acoplamiento. En primer lugar, la resolución de cualquier ecuación tipo Karplus da múltiples soluciones para el ángulo diedro incógnita ϕ (como ejemplo véase la **figura 2.3.8** en el **apartado 2.3.2.1**), lo que, evidentemente, ha limitado su uso como restricción conformacional directa. En segundo lugar, la presencia de movimientos internos que afecten considerablemente al ángulo diedro impide que se pueda utilizar el valor experimental de forma cuantitativa, ya que representa un promedio temporal. Por todo ello, las ecuaciones mencionadas generalmente se aplican en sentido inverso, es decir, una vez determinada la conformación molecular, mediante otros parámetros de RMN (NOEs) y cálculos de modelización molecular, los ángulos diedros correspondientes a dichas conformaciones se utilizan para calcular las constantes de acoplamiento teóricas esperadas, que se comparan con las experimentales.

Para el caso de oligosacáridos, se pueden destacar varios aspectos conformacionales que reducen en cierta forma los problemas asociados a estas ecuaciones. En primer lugar, para residuos de piranosas relativamente rígidos, las variaciones de los ángulos diedros entre los protones anulares son relativamente

pequeñas, y, en torno a un sólo mínimo energético. En segundo lugar, el problema de múltiples-soluciones se reduce considerablemente si consideramos que, en el mejor de los casos, tendremos una serie de 4 constantes de acoplamiento (de ${}^3J_{H1,H2}$ a ${}^3J_{H4,H5}$) que definen la geometría anular, por lo que la solución se reduce a aquella que simultáneamente se cumple para todos los acoplamientos.

Finalmente, un aspecto importante a considerar es que las constantes de acoplamiento están influenciadas por la existencia de procesos dinámicos, como por ejemplo equilibrios conformacionales en el caso de anillos de azúcar que no sean rígidos. En este caso, los datos que se obtienen experimentalmente constituyen un valor promedio formado a partir de los valores de los confórmeros individuales, 3J_i , ponderados a través de las fracciones molares, p_i , de cada confórmero presente en el equilibrio:

$${}^3J_{\text{exp}} = \sum_i p_i {}^3J_i \quad \text{Ec. 2.1.3}$$

La aplicación de la **ecuación 2.1.3** nos permite, conociendo las especies que participan en el equilibrio, sus constantes de acoplamiento teóricas (**Ec. 2.1.2**), y las constantes de acoplamiento experimentales, obtener las fracciones molares de cada uno de los confórmeros mediante un ajuste matemático por mínimos cuadrados.

2.1.3 EL EFECTO OVERHAUSER NUCLEAR EN LA DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE OLIGOSACÁRIDOS.

Por efecto Overhauser nuclear (NOE) se conoce el cambio en la intensidad neta de una señal de un determinado núcleo en un espectro de RMN como consecuencia de una perturbación (saturación o inversión, por ejemplo) de la resonancia perteneciente a otro núcleo que se encuentra próximo en el espacio a éste primero²⁴. El origen del NOE se encuentra en la redistribución de

poblaciones que se produce como consecuencia de un determinado tipo de relajación que contribuye al reestablecimiento del equilibrio termodinámico tras la perturbación, la relajación cruzada dipolo-dipolo.

El valor del NOE en análisis estructural y conformacional estriba en su dependencia de la proximidad de los átomos en el espacio, y, por lo tanto, en su contenido de información sobre la estructura tridimensional de las biomoléculas. Para la determinación de estructuras tridimensionales de oligosacáridos, esta relación “NOE \leftrightarrow proximidad espacial” se puede explotar, principalmente de dos formas: realizando un análisis *cualitativo* del patrón de NOEs interresiduales observados, reduciendo el número de conformaciones posibles, por eliminación de aquellas que no son compatibles con dichas observaciones; y/o realizando un análisis *cuantitativo* de las constantes de velocidad de relajación cruzada longitudinal σ_{ij}^{NOE} , que, una vez conocida su relación matemática para el sistema molecular objeto del estudio, nos permite obtener distancias derivadas de NOEs, generando de esta forma estructuras de mucha mayor resolución. En cualquier caso, de nuevo, el problema suele ser el escaso número de NOEs que se obtienen para las estructuras oligosacarídicas, lo que hace necesaria la inclusión de datos estructurales teóricos (mecánica molecular) para poder llevar a cabo una interpretación cuantitativa de los resultados espectroscópicos. En este sentido, la espectroscopía nos permite excluir aquellas conformaciones que, siendo energéticamente favorables, no son compatibles con las observaciones de RMN, mientras que la mecánica molecular nos permite descartar aquellas conformaciones que, siendo compatibles con los datos espectroscópicos, estén energéticamente desfavorecidas.

2.1.3.1 Análisis cualitativo de NOEs interglicosídicos. NOEs exclusivos.

Uno de los factores principales que determinan la geometría global de los oligosacáridos es la orientación relativa de sus unidades monosacarídicas entre sí, que puede ser descrita por los ángulos de torsión Φ y Ψ alrededor de los

enlaces glicosídicos C1'-O y O-C4 (se priman los núcleos pertenecientes al monosacárido del extremo no-reductor, **figura 2.1.2**).

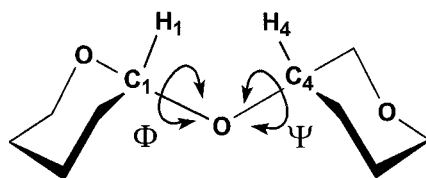


Figura 2.1.2 Definición de los ángulos de torsión glicosídicos para uniones 1→4. $\Phi \equiv H1'-C1'-O-C4$; $\Psi \equiv C1'-O-C4-H4$.

En RMN de carbohidratos es habitual hacer un análisis de la geometría de los enlaces glicosídicos haciendo uso de los denominados “NOEs exclusivos”. Este tipo de análisis requiere complementar la información experimental de NOEs (lo que supone distancias típicamente menores de 3 – 3.5 Å, para hexasacáridos como los que se estudian en esta tesis), con las predicciones de la mecánica molecular. Mediante modelado molecular, podemos obtener mapas de energía potencial (capítulo 3) que nos van definir las regiones favorables del espacio configuracional (Φ, Ψ), para cada tipo de enlace glicosídico, así como las distancias interprotónicas que caractericen a dichas regiones.

Así, “NOE exclusivo” para una determinada conformación, o mínimo energético en el mapa (Φ, Ψ), será aquel que corresponde a una pareja de protones que sólo pueden estar a distancias favorables para la observación del NOE en la región (Φ, Ψ) correspondiente a dicho mínimo. De esta forma, la presencia de múltiples mínimos supondría la observación de los NOEs exclusivos de cada uno de ellos, mientras que la ausencia de alguno de ellos, si bien no puede asegurar una situación monoconformacional, sí permitiría descartar la participación de dicho mínimo en el equilibrio conformacional. La estrategia de NOEs exclusivos, a pesar de su rudeza, ha dado excelentes resultados en el campo de los carbohidratos, gracias a la corta distancia a la que se observa el NOE en estos compuestos.

2.1.3.2 Análisis cuantitativo de NOEs interglucosídicos. Distancias interprotónicas.

Las intensidades de un espectro 2D NOESY para un tiempo de mezcla t_m están representadas por la matriz $\underline{V}(t_m)$ según:

$$\underline{V}(t_m) = \exp(-\underline{R} \cdot t_m) \cdot \underline{V}(0)$$

donde \underline{R} es la matriz de relajación constituida por los elementos:

$$\rho_{ii} = Q \cdot \sum_{i,j} (J_{0,ij}(\omega) + 3J_{1,ij}(\omega) + 6J_{2,ij}(\omega)) + \rho_{1,i}$$

$$\sigma_{ij} = Q [6J_{2,ij}(\omega) - J_{0,ij}(\omega)]$$

$$\text{donde: } Q = 0.1\gamma^4 \hbar^2$$

En principio, los elementos de fuera de la diagonal se pueden relacionar con la distancia interprotónica, siendo el volumen de los picos de cruce función de las relaciones espaciales mutuas de todos los protones de la molécula. Sin embargo, tanto la constante de velocidad de relajación cruzada, σ_{ij} (elementos de fuera de la diagonal), como la de autorrelajación, ρ_{ii} (elementos de la diagonal) dependen de las densidades espectrales. La función de densidad espectral, que formalmente es la integral de la función de correlación del vector internuclear considerado, refleja la capacidad de los movimientos moleculares para producir relajación en función de su tiempo de correlación y amplitud.

Es decir, la relación entre los volúmenes de los picos de cruce dependen de la disposición relativa de los protones de la molécula, pero además del movimiento absoluto de cada par de protones como refleja la función de densidad espectral. Esta última influencia complica el análisis, puesto que es, en principio independiente para cada par de núcleos considerado. La primera aproximación que se asume es considerar un comportamiento de sólido rígido a la molécula (todos los vectores ij se mueven igual y pueden ser descritos por la misma función $J(\omega)$). Asumido este punto, es necesario considerar que cada pareja de

núcleos no se encuentra aislada, sino que forma parte de una red de sistemas que relajan conjunta y simultáneamente.

La *aproximación de los espines aislados* (ISPA) asume que para tiempos de mezcla suficientemente cortos sólo la velocidad de relajación cruzada (el término fuera de la diagonal correspondiente) controla la intensidad de los picos de cruce. Esta aproximación sólo es válida para tiempos relativamente cortos respecto a T_1 . Bajo esta aproximación se calcula σ a partir de los volúmenes de los picos de cruce a varios tiempos de mezcla suficientemente cortos y ésta se relaciona con una distancia conocida mediante:

$$r_{ij} = r_{ref} \left(\frac{\sigma_{ref}}{\sigma_{ij}} \right)^{1/6}$$

Por otro lado los efectos de la relajación en sistemas de múltiples espines se pueden tratar rigurosamente si se mide completamente la matriz de intensidad \underline{V} . A partir de ella se calcula la matriz relajación cuyos elementos fuera de la diagonal contienen la información de distancia interprotónica deseada. Prácticamente es imposible medir experimentalmente todos los volúmenes necesarios para realizar este cálculo por lo que es necesario recurrir a métodos iterativos conocidos como aproximación de la matriz de relajación completa.

Funciones de densidad espectral.

Relacionan los parámetros dinámicos de distintos modelos de movimiento con la eficiencia de estos para estimular procesos de relajación. Se proponen formas matemáticas de un modelo de movimiento que se traduce en la correspondiente función espectral. Existen varios modelos:

- **Modelo I**

Corresponde al movimiento de un sólido rígido, todas las distancias internucleares son constantes, e isotrópico, no hay ejes de rotación preferidos.

$$J(\omega) = \frac{\tau_0}{1 + (\omega\tau_0)^2}$$

Donde τ_0 es el tiempo de correlación global que corresponde al tiempo necesario para una reorientación angular de un radián y ω es la frecuencia de resonancia del núcleo considerado en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$.

▪ Modelo V “libre de modelo o Lipari-Szabo”

Para evitar la sobreinterpretación que imponen los modelos matemáticos del movimiento sólo asume un comportamiento isotrópico y considera que todos los movimientos se pueden dividir en globales e internos, los debidos a la flexibilidad molecular. Para ello se introduce un tiempo de correlación y un parámetro de orden para los movimientos internos en la ecuación de la densidad espectral. En este caso se asume que los movimientos internos son mucho más rápidos que los globales y que ambos son independientes.

$$J(\omega) = S^2 \frac{\tau_0}{1 + (\omega\tau_0)^2} + (1 - S^2) \frac{\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \quad \text{con:} \quad \tau^{-1} = \tau_0^{-1} + \tau_{\text{int}}^{-1}$$

Hay una serie de simplificaciones de este modelo que se han empleado cuando uno de los parámetros que describen el movimiento es despreciable y son útiles para tratar datos de baja calidad. Por ejemplo, en el caso de movimientos internos muy rápidos se puede emplear la siguiente función.

$$J(\omega) = S_f^2 \frac{\tau_0}{1 + (\omega\tau_0)^2}$$

Por el contrario hay otros modelos que consideran divisiones más complejas entre movimientos globales, rápidos e intermedios como el de Clore, del que también existen simplificaciones dependiendo de las contribuciones relativas de los movimientos a la relajación.

$$J(\omega) = S^2 \frac{\tau_0}{1+(\omega\tau_0)^2} + (1-S_f^2) \frac{\tau_f}{1+(\omega\tau_f)^2} + (S_f^2 - S^2) \frac{\tau_s}{1+(\omega\tau_s)^2}$$

$$S^2 = S_f^2 \cdot S_s^2$$

$$\tau_i^{-1} = \tau_0^{-1} + \tau_i^{-1}, \quad i = f, s$$

Por último, si no se asume que el movimiento global de la molécula es isotrópico es necesario emplear expresiones que contemplen la existencia de distintos ejes de rotación molecular tanto considerando o no los movimientos internos como en:

$$J(\omega) = S^2 J_{anisot}(\omega) + (1-S^2) \frac{\tau}{1+(\omega\tau)^2} \quad \text{con:} \quad \tau^{-1} = \tau_0^{-1} + \tau_{int}^{-1}$$

donde:

$$J_{anisot}(\omega) = \frac{1}{4} \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)^2 \tau_a}{1+(\omega\tau_a)^2} + \frac{(3 \text{sen}^2 \theta \cos^2 \theta) \tau_b}{1+(\omega\tau_b)^2} + \frac{3 \text{sen}^4 \theta \tau_c}{4 1+(\omega\tau_c)^2}$$

τ_a , τ_b , y τ_c vienen dados por:

$$\tau_a = \tau_{\perp}$$

$$\frac{1}{\tau_b} = \frac{5}{6\tau_{\perp}} + \frac{1}{6\tau_{\parallel}}$$

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{3\tau_{\perp}} + \frac{2}{3\tau_{\parallel}}$$

Aplicaciones de la RMN al estudio de procesos dinámicos

La resonancia magnética nuclear es una espectroscopía especialmente sensible a procesos dinámicos a lo largo de una amplia escala de tiempos. Por este motivo ha sido empleada extensamente para el estudio de estos procesos.

Entre estos métodos destaca la espectroscopía de relajación de spin, como una técnica potente para la caracterización de procesos dinámicos en el rango de picosegundos hasta nanosegundos, donde se encuentran los movimientos globales e intramoleculares de biomoléculas. Esta aproximación se basa en la dependencia de los mecanismos de relajación dipolo-dipolo o de anisotropía del desplazamiento químico con los movimientos moleculares. El origen de esta dependencia está en que la eficacia de los mecanismos de relajación está determinada por la existencia de "pulsos locales" tales que sean capaces de inducir transiciones entre estados, y en que estos pulsos locales se generan por los campos magnéticos fluctuantes asociados a estos movimientos moleculares.

En la espectroscopia de relajación de espín se observa la recuperación del estado de equilibrio después de una perturbación de acuerdo con determinados mecanismos de relajación, evitando en lo posible los efectos de correlación cruzada. Recientemente se está proponiendo emplear estos efectos de interferencia para complementar la información convencional. Esta información convencional se basa en la relajación espín-red, que describe el retorno de la magnetización longitudinal al equilibrio (\hat{I}_z), la relajación espín-espín, responsable de la destrucción de magnetización transversal (\hat{I}_{xy}) y la relajación cruzada dipolo-dipolo, que describe los cambios de población en el estado de espín. Adicionalmente se puede estudiar la dependencia de la relajación de coherencias de dos espines ($2\hat{S}_z\hat{I}_z$ y $2\hat{S}_x\hat{I}_z$). Para cuantificar estos fenómenos se emplean las constantes de velocidad de relajación, R1 y R2, o el efecto NOE en el caso de la relajación cruzada.

La dependencia de estas magnitudes de los movimientos moleculares se refleja en que las expresiones para las constantes de velocidad de relajación según estos mecanismos son combinaciones lineales de funciones densidad espectral. En el caso de un heteronúcleo protonado, la relajación está dominada por la interacción dipolar con el protón directamente unido a él y por la anisotropía del desplazamiento químico. Las constantes de velocidad de relajación longitudinal y transversal vienen dadas por :

$$R_1 = \left(\frac{d^2}{4} \right) [J(\omega_H - \omega_X) + 3J(\omega_X) + 6J(\omega_H + \omega_X)] + c^2 J(\omega_X)$$

$$R_2 = \left(\frac{d^2}{8} \right) [4J(0) + J(\omega_H - \omega_X) + 3J(\omega_X) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_X)] \\ + \left(\frac{c^2}{6} \right) [4J(0) + 3J(\omega_X)]$$

$$d = \left(\frac{\mu_0 h \gamma_X \gamma_H}{8\pi^2} \right) \langle r_{XH}^{-3} \rangle$$

$$c = \frac{\Delta\sigma \cdot \omega_X}{\sqrt{3}}$$

Para este caso todas las variables son conocidas excepto las funciones densidad espectral que dependen de la frecuencia de trabajo y de parámetros que caracterizan el movimiento ($J(\omega)$).

El análisis de los datos se puede realizar, bien directamente analizando las constantes de relajación R_1 y R_2 o analizando las funciones de densidad espectral. Estas se determinan bien a partir de las velocidades de relajación o mediante mapeo de la densidad espectral. En ambos casos el formalismo libre de modelo de Lipari-Szabo ha sido el más empleado para la descripción del movimiento en biomoléculas. De esta forma finalmente se consigue describir el movimiento hidrodinámico global que depende de la forma de la biomolécula y

los movimientos internos que dependen de la dinámica rápida local. Estos últimos describen la flexibilidad o rigidez de subestructuras de la molécula.

2.2 OBJETIVOS

Está ampliamente aceptado que en el caso de interacciones intermoleculares implicadas en procesos biológicos, la/s conformación/es de las especies interaccionantes, así como la dinámica de dichas moléculas en disolución podría influenciar considerablemente las constantes de equilibrio de asociación. Las interacciones carbohidrato-proteína están energéticamente gobernadas por el término de variación de energía libre (ΔG). Por un lado, el análisis de la estructura tridimensional molecular nos puede proporcionar una descripción del término entálpico (ΔH). Por otro, para la descripción termodinámica completa del proceso de interacción, también se hace necesario determinar las contribuciones entrópicas ($T \cdot \Delta S$). Es decir, necesitamos conocer no sólo las estructuras inicial y final de las moléculas interaccionantes, sino también sus características dinámicas iniciales y finales.

Entre los objetivos principales de esta tesis, que se encuadran en este capítulo, se encuentra la obtención y discusión del mayor número posible de datos espectroscópicos de RMN que nos den información sobre las conformaciones adoptadas por los oligosacáridos sintéticos **1,2,3**, y **4** (**figura 2.1.3**), así como su dinámica global e interna, en disolución acuosa.

Todos estos datos estructurales, en conjunción con los resultados de actividades biológicas, así como futuros estudios cuantitativos de la interacción con el factor de crecimiento (FGF), por otras técnicas (microcalorimetría, SPR, etc) deben crear el marco de trabajo para el establecimiento de relaciones estructura-actividad y elucidación de las bases moleculares del proceso de activación para la mitogénesis del FGF por glicosaminoglicanos.

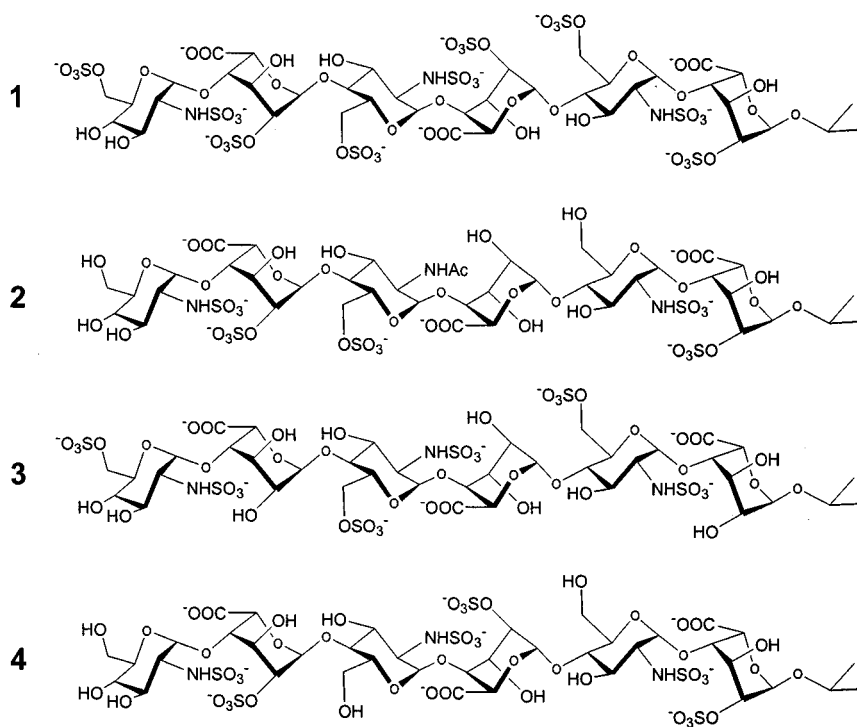


Figura 2.1.3 Estructura química de los hexasacáridos 1, 2, 3, y 4.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 ESTUDIO ESPECTRAL

2.3.1.1 Observaciones sobre la preparación de las muestras de RMN

Una característica importante de los oligosacáridos modelos de heparina es el alto número de sustituyentes ácidos (grupos sulfato y carboxilato) que presentan, lo que les confiere una elevada densidad de carga negativa a valores de pH próximos a la neutralidad o superiores. En este sentido, cabe destacar que la heparina endógena es considerada el ácido más fuerte presente en el cuerpo humano^{25,26}, y, como tal, en condiciones fisiológicas se presenta como un polielectrolito aniónico altamente cargado, con todos los grupos sulfato y carboxilato desprotonados (el de carácter ácido más débil, el grupo carboxilato, se titula entre pH 2 y pH 6)²⁷.

Este aspecto debe ser considerado en el proceso de preparación de las muestras, ya que, como se comenta a continuación, se hace necesario asegurar la "homogeneidad" en cuanto al tipo de contraíón. Esto es una consecuencia directa de dicho carácter polielectrolítico, que hace que haya una fuerte tendencia a la entrada de cationes en un determinado volumen que rodea al oligo/poli-sacárido (volumen de condensación) para la compensación de parte de la elevada densidad de carga negativa^{28,29}. Una de las principales consecuencias es que de esta forma se posibilita la asociación al polianión de cationes paramagnéticos que pudieran estar presentes en los disolventes, con el consecuente ensanchamiento de líneas en los espectros de ¹H-RMN. En el caso de la heparina, además de los efectos de los cationes paramagnéticos, se debe evitar la presencia indeseada de determinados cationes que se pueden asociar específicamente. Existen evidencias de que tipos diferentes de contraíones pueden incorporarse al volumen de condensación de formas diferentes: "territorialmente" (por ejemplo Mg²⁺)^{30,31}, donde el contraíón conserva intacta su esfera de solvatación e interacciona deslocalizadamente, o "específicamente" (por ejemplo Ca²⁺, Zn²⁺)³¹ donde el contraíón pierde parte de las moléculas de disolvente de su esfera de solvatación

y satisface sus requerimientos por interacción electrostática directa con átomos electronegativos del soluto (interacción localizada). Es este último caso el que debemos tener en cuenta, ya que la presencia de este tipo de cationes (p.ej. Ca^{2+}) puede producir importantes variaciones en los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C para aquellos núcleos próximos al sitio de asociación, así como producir variaciones estructurales derivadas de dicha interacción (véase capítulo 4). Por lo tanto uno de los objetivos iniciales en el estudio por RMN de las sales sódicas de los modelos sintéticos objetos de esta tesis, fue minimizar el efecto de contraiones no deseados, diferentes al catión Na^+ .

Desde el punto de vista experimental, los oligosacáridos sintéticos 1, 2, 3, y 4 presentan, característicamente, una resolución natural muy baja en los espectros de ^1H -RMN cuando no se lleva a cabo ningún tipo de tratamiento previo a la medida en el espectrómetro, mostrando señales extremadamente anchas. Que esto es un efecto asignable a los contraiones lo demuestra el hecho de que dicho problema de resolución se solventa de forma satisfactoria mediante la elución de las muestras a través de una columna de intercambio catiónico fuerte (Dowex- Na^+)^{32,33,34,35}.

Interesantemente, tras los experimentos encaminados al estudio de la interacción "heparina - cationes divalentes" con el hexasacárido modelo 1 (capítulo 4), se pudo establecer una mejor solución al problema de la resolución espectral. Ésta consiste en añadir previamente CaCl_2 en exceso suficiente y, posteriormente, llevar a cabo la elución en la columna de intercambio para obtener de esta manera la forma sódica. De este modo, la mayor afinidad por el catión Ca^{2+} hace que se produzca el intercambio catiónico completo, desplazando tanto a los iones sodio como a las trazas de impurezas paramagnéticas de la nube de contraiones que rodea al soluto, facilitando de este modo su eliminación en la columna.

Por otro lado, una vez resuelto el problema de los contraiones, y con el objetivo de buscar las condiciones experimentales óptimas para la resolución

espectral, la muestra 1 se sometió a diferentes condiciones de preparación y experimentación. De esta forma se pudo determinar que las variaciones de temperatura (5 – 35°C) no tienen un efecto significativo sobre los espectros, ni en términos de resolución ni de desplazamientos químicos. En relación a la fuerza iónica de la disolución, la adición de NaCl (hasta 28 mM) tampoco se tradujo en efecto alguno sobre los espectros de ^1H -RMN.

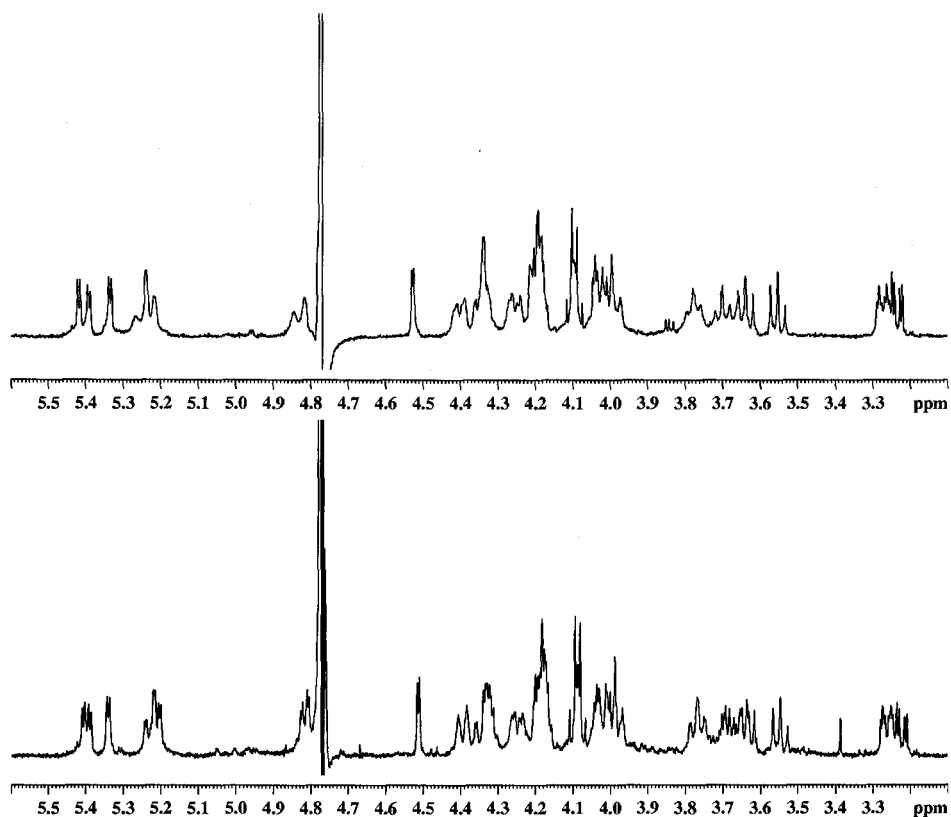


Figura 2.3.1 Espectros $1\text{D-}^1\text{H}$ -RMN a 500 MHz (D_2O , 25 °C) de la muestra 1 a pH 7 (fig. superior) y a pH 10.6 (fig. inferior)

En cuanto al pH, en los espectros en la región ácida (pH 3.8 - 5.6) el efecto del equilibrio de protonación de los carboxilatos de los anillos de ácido L-

idurónico se tradujo en un desplazamiento a campo bajo de las señales de los protones H-5 de los tres residuos. En estas condiciones, dos son los principales problemas que surgen: por un lado, una disminución apreciable de la resolución espectral, y por otro, la posibilidad de que diferencias en los valores de pKa de los tres grupos carboxilato hagan que coexistan en disolución múltiples especies diferentemente protonadas. En el otro extremo, a pH suficientemente básico (pH ≥ 10) se observa un considerable aumento de la resolución en todo el espectro, sin ninguna variación de desplazamientos químicos (**figura 2.3.1**).

Este importante aumento en la resolución en todo el espectro en condiciones fuertemente básicas no ha podido ser esclarecido inequívocamente, aunque podría ser atribuido al comportamiento ácido-base de los metales catiónicos que, formando parte de la nube de contraiones, estén afectando a la resolución de las señales de RMN. De cualquier manera, no se pudo obtener ninguna ventaja de esta mejora de la calidad espectral debido a que la muestra se mostró inestable en dichas condiciones, originando epóxidos por desulfatación de los anillos de iduronato³⁵.

En resumen, podemos afirmar que la calidad espectral de estos oligosacáridos sintéticos modelos de heparina es fuertemente dependiente de la preparación de las muestras y que, para asegurar una reproducibilidad de los experimentos de RMN, y de los datos estructurales derivados de éstos, dichas muestras deben ser tratadas previamente con el objetivo de asegurar la homogeneidad respecto al tipo de contraión. El protocolo “sal sódica \rightarrow sal cálcica \rightarrow sal sódica” descrito anteriormente se ha mostrado eficiente para tal efecto. En cuanto a las condiciones de experimentación, se determinó llevar a cabo todos los experimentos de RMN a pH ~ 7 y 25 °C.

El efecto que cada uno de los factores comentados anteriormente tiene sobre los espectros de RMN puede ser estudiado, evidentemente, de forma más amplia a la que se ha llevado a cabo en el marco de esta tesis, lo que podría resultar en una mejora del protocolo preparativo, con el incremento consecuente

en la calidad espectral. Las principales limitaciones para llevar a cabo este tipo de estudios han sido las pequeñas cantidades de producto disponibles para los estudios estructurales por RMN.

2.3.1.2 Asignación espectral

El primer paso del estudio estructural por RMN para cada uno de los oligosacáridos consistió, lógicamente, en la asignación inequívoca de los desplazamientos químicos observados en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN a los núcleos correspondientes dentro de cada oligosacárido. Para ello se hizo uso de experimentos bidimensionales homonucleares DQF-COSY³⁶, TOCSY³⁷, y NOESY³⁸, y de experimentos de correlación heteronuclear ^{13}C - ^1H HSQC o HMQC³⁹.

Por medio de los experimentos COSY y TOCSY se pudieron identificar los tipos de sistemas de espín presentes, trazables a partir de los dobletes anoméricos a campo bajo: tres sistemas correlacionando 5 espines cada uno (residuos de L-iduronato) y otros tres consistentes en 7 espines (residuos de D-glucosamina), para los compuestos 1, 2, y 3. Para el compuesto 4, sin embargo, la correlación para los sistemas de espín no se puede extender a más de 5 núcleos debido al solapamiento de señales. A pesar de esto, los sistemas correspondientes a los residuos de L-idurónico se pueden identificar por el desplazamiento químico característico de los protones H-5^{33,34}, generalmente aislados en el entorno de 4.8 ppm para residuos internos en la heparina. Por otro lado, además, los anillos de D-glucosamina son identificables por el desplazamiento químico característico del doblete correspondiente al protón H-2, también generalmente aislados en el entorno de 3.3 ppm para residuos N-sulfatados.

De forma general para 1, 2, 3, y 4, la adscripción de los sistemas de espín a cada residuo monosacárido concreto se basó en los siguientes hechos experimentales, compartidos por los 4 hexasacáridos:

1. Identificación de los residuos terminales: Los sistemas de espín correspondientes a los residuos terminales, reductor y no reductor (L-IdoA-a y D-GlcN-f, respectivamente), se identifican fácilmente por los desplazamientos químicos *singulares* de los protones H-4, para el residuo f (H-4f), y H-5, para el residuo a (H-5a), ambos característicamente desplazados a campo alto respecto a los protones equivalentes pertenecientes a los restantes residuos. Además, como dato adicional, el residuo L-IdoA-a presenta siempre un pico de cruce "característico" en los experimentos NOESY que correlaciona espacialmente su protón H-1 con el protón H-C< del radical isopropilo situado en dicho extremo reductor.
2. Identificación de los restantes residuos: Los restantes sistemas de espines se pueden asignar gracias a los picos de cruce interglucosídicos en los experimentos NOESY, que correlacionan los núcleos espacialmente próximos cercanos al enlace glicosídico y que pertenecen a distintos residuos monosacáridicos. En el apartado 2.3.2.3 se da una relación de los NOEs interglucosídicos observados experimentalmente, para cada uno de los oligosacáridos. En este paso, la correlación entre residuos se puede realizar en el sentido "reductor → no reductor" o viceversa, ya que ambos extremos se identificaron con anterioridad.

Por otro lado, la asignación estereoespecífica (pro-*R* , pro-*S*) de los protones H6 de los residuos de D-glucosamina se pudo llevar a cabo, para los compuestos 1, 2, y 3, gracias a que los valores pequeños de $^3J_{H5,H6}$ y $^3J_{H5,H6'}$ (en torno a 3 Hz) indican una población mayoritaria de confórmeros *gg*, con respecto a la torsión ω . Además, en todos los casos se detecta un pico de cruce en los experimentos NOESY correlacionando el protón H-4 de cada D-glucosamina con uno de sus protones H-6. La construcción del modelo *gg* muestra con claridad que, en este confórmero, el protón más próximo en el espacio a H-4 es el protón con asignación pro-*R* (figura 2.3.2). Para el hexasacárido 4, el solapamiento de las señales H-5, H-6, y H-6', impide un análisis de este tipo.

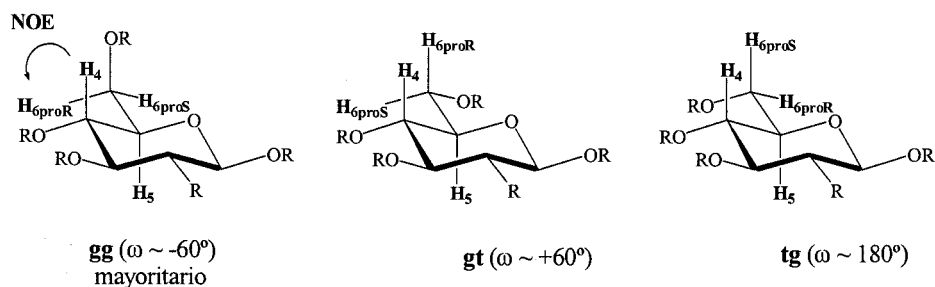


Figura 2.3.2 Modelos de los tres conformeros posibles por rotación en torno al ángulo diedro ω (O5-C5-C6-O6). Para el conformero gg se indica el NOE observado.

Para la asignación de las señales de ^{13}C se emplearon experimentos de heterocorrelación ^{13}C - ^1H HSQC. Los espectros, en general, presentan una dispersión de señales suficiente como para permitir la asignación inambigua de todas ellas. No obstante, en aquellos casos en los que el solapamiento generaba algún tipo de ambigüedad se empleó como criterio adicional la comparación con los desplazamientos químicos de ^{13}C descritos para derivados de heparina.³⁴

La **tablas 2.3.1** y **2.3.2** muestran la asignación completa de las señales en los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, respectivamente, para los hexasacáridos sintéticos **1**, **2**, **3**, y **4**. En la última columna se han incluido, a fines comparativos, los valores de desplazamiento químico recogidos en la bibliografía para la heparina natural³². Estos datos, junto con los que se exponen a lo largo de este capítulo, presentan el interés para nuestro laboratorio de permitir caracterizar espectroscópicamente, sobre oligosacáridos de estructura química perfectamente definida, los cambios que introducen las distintas variaciones funcionales sobre los parámetros observables de RMN, así como las consecuencias estructurales que de estos cambios se puedan derivar. Esto constituye el objeto de discusión de los apartados subsiguientes.

Unidad	Protón	1	2	3	4	Heparina
a	H-1	5.22	5.22	4.94	5.23	5.23
	H-2	4.16	4.16	3.56	4.16	4.37
	H-3	4.17	4.19	4.07	4.19	4.22
	H-4	4.02	4.00	4.00	4.00	4.14
	H-5	4.51	4.50	4.50	4.51	4.82
b	H-1	5.31	5.32	5.34	5.31	5.42
	H-2	3.25	3.23	3.23	3.21	3.31
	H-3	3.68	3.64	3.65	3.69	3.69
	H-4	3.76	3.67	3.71	3.68	3.79
	H-5	3.98	3.83	3.98	3.85	4.05
	H-6	4.38 [†]	3.84 [†]	4.31 [†]	3.86	4.42
	H-6'	4.23 [‡]	3.78 [‡]	4.18 [‡]	3.84	4.30
c	H-1	5.25	4.89	5.00	5.25	5.23
	H-2	4.32	3.66	3.77	4.32	4.37
	H-3	4.19	3.85	4.10	4.22	4.22
	H-4	4.07	4.05	4.03	4.01	4.14
	H-5	4.82	4.74	4.80	4.85	4.82
d	H-1	5.37	5.15	5.31	5.27	5.42
	H-2	3.26	3.95	3.22	3.22	3.31
	H-3	3.64	3.74	3.64	3.69	3.69
	H-4	3.76	3.76	3.72	3.68	3.79
	H-5	3.98	3.99	3.99	3.85	4.05
	H-6	4.39 [†]	4.37 [†]	4.32 [†]	3.86	4.42
	H-6'	4.24 [‡]	4.23 [‡]	4.18 [‡]	3.84	4.30
e	H-1	5.20	5.18	4.99	5.24	5.23
	H-2	4.31	4.31	3.76	4.31	4.37
	H-3	4.17	4.19	4.08	4.22	4.22
	H-4	4.08	4.07	4.04	4.02	4.14
	H-5	4.80	4.77	4.79	4.84	4.82
f	H-1	5.40	5.38	5.33	5.28	5.42
	H-2	3.21	3.18	3.19	3.20	3.31
	H-3	3.61	3.61	3.61	3.64	3.69
	H-4	3.53	3.42	3.54	3.44	3.79
	H-5	3.96	3.80	3.91	3.80	4.05
	H-6	4.33 [†]	3.85 [†]	4.34 [†]	3.80	4.42
	H-6'	4.18 [‡]	3.76 [‡]	4.14 [‡]	3.76	4.30

[†] pro-R [‡] pro-S

Tabla 2.3.1 Desplazamientos químicos de ^1H [δ (ppm)], en D_2O , de los hexasacáridos 1, 2, 3, y 4 (25 °C), y de la heparina natural (40 °C)³⁴.

Unidad	Carbono	1	2	3	4	Heparina
a	C-1	99.7	99.9	101.4	99.5	102.1
	C-2	78.7	78.6	71.9	78.3	78.9
	C-3	71.6	71.0	70.9	70.6	72.1
	C-4	78.5	78.6	77.6	78.2	79.0
	C-5	72.0	70.8	71.1	70.5	72.3
b	C-1	99.4	99.8	98.1	99.4	99.5
	C-2	60.6	60.8	60.2	60.6	60.7
	C-3	72.2	72.1	72.2	71.9	72.5
	C-4	78.4	79.7	79.8	79.8	78.8
	C-5	71.8	73.6	71.4	73.5	72.0
	C-6	68.9	62.5	68.7	62.0	69.2
c	C-1	101.6	104.2	104.5	101.4	102.1
	C-2	78.4	72.5	70.9	76.7	78.9
	C-3	71.6	72.2	70.0	69.9	72.1
	C-4	78.4	77.5	76.8	78.0	79.0
	C-5	72.0	72.6	70.9	70.5	72.3
d	C-1	99.3	97.1	98.1	99.7	99.5
	C-2	60.6	56.1	60.2	60.5	60.7
	C-3	72.2	72.4	72.2	71.9	72.5
	C-4	78.4	78.4	79.8	79.8	78.8
	C-5	71.8	72.0	71.1	73.5	72.0
	C-6	68.9	69.0	68.7	62.0	69.2
e	C-1	101.6	101.9	104.5	101.5	102.1
	C-2	78.4	78.5	70.8	76.7	78.9
	C-3	71.6	71.7	70.0	69.9	72.1
	C-4	78.4	78.4	76.8	77.9	79.0
	C-5	72.0	71.8	70.9	70.5	72.3
f	C-1	99.2	99.4	98.1	99.7	99.5
	C-2	60.6	60.7	60.2	60.5	60.7
	C-3	73.5	73.8	73.6	73.4	72.5
	C-4	72.0	72.6	71.5	72.3	78.8
	C-5	72.6	74.4	72.2	74.1	72.0
	C-6	69.1	63.0	68.7	62.7	69.2

Tabla 2.3.2 Desplazamientos químicos de ^{13}C [δ (ppm)], en D_2O , de los hexasacáridos 1, 2, 3, y 4 (25 °C), y de la heparina natural (40 °C)³⁴.

2.3.1.3 Efecto de la variación en el patrón de sustitución sobre los desplazamientos químicos. Estudio comparativo.

Tal y como se recoge en la bibliografía^{33,34}, es posible modificar químicamente el patrón de sulfatación de la heparina natural y del sulfato de heparano. Así, por ejemplo, se pueden llevar a cabo eliminaciones y resulfataciones selectivas (grupos N-SO₃ y O-SO₃), y/o N-acetilaciones en los anillos de D-glucosamina. Esto se representa esquemáticamente en la **figura 2.3.3**.

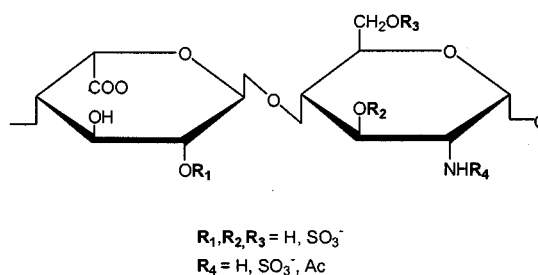


Figura 2.3.3 Posibles patrones de sulfatación/acetilación para heparinas modificadas químicamente

Estas estrategias han sido empleadas ampliamente, tanto con la intención de generar nuevos fármacos, como con la de determinar la importancia relativa de los patrones de sulfatación para una determinada actividad biológica. De hecho, el diseño de algunos oligosacáridos en nuestro grupo de investigación se ha inspirado, en parte, en estas estrategias.

El efecto de la sustitución en derivados de heparina en parámetros de RMN ha sido investigado por varios grupos^{33,34}. Así, ha sido posible determinar que los desplazamientos químicos varían sistemáticamente, afectando principalmente a los núcleos más próximos, pero que también pueden afectar a posiciones remotas⁴⁰. Algunos autores proponen que los cambios detectados sugieren transiciones conformacionales, bien dentro de los residuos monosacáridicos, bien en los enlaces glicosídicos, que podrían tener

implicaciones biológicas^{33,40}. En este apartado el estudio se centra en establecer una comparación entre los efectos de las distintas sustituciones en nuestros modelos sintéticos, con los datos existentes para heparinas químicamente modificadas.

Así, de los datos de los desplazamientos químicos (**tabla 2.3.1** y **tabla 2.3.2**) de **1**, **2**, **3**, y **4** se desprende el siguiente razonamiento.:

- La comparación de los datos de nuestro modelo sintético **1** con la heparina natural, de la que es análogo, muestra una alta concordancia. Las únicas diferencias apreciables se producen en la señal H-2a (+0.21 ppm; el signo positivo indica desplazamiento a campo alto [$\Delta\delta = \delta_{\text{HEP}} - \delta_{\text{I}}$] respecto del valor para el producto natural), y las señales H-5a (+0.31 ppm) y H-4f (+0.26 ppm) en el espectro de ^1H . En el espectro de ^{13}C , se observan variaciones para C-1a (+2.4 ppm), y C-4f (+6.8 ppm). Es decir, las diferencias más apreciables se observan para los residuos terminales del oligosacárido, **a** y **f**. Ello es esperable debido a que éstos son los residuos que mayores diferencias presentan en entorno químico respecto al polisacárido natural, como consecuencia de la diferencia de tamaño. Para la heparina natural, de mucha mayor longitud, los valores de desplazamiento químico registrados³⁴ están promediados para todos los residuos de una clase a lo largo de la cadena (todos son residuos “internos”). Respecto a la posición H-4f, ésta es, además, químicamente diferente, al ser un hidroxilo libre. En el resto de señales sólo se aprecian pequeñas variaciones generales atribuibles a las diferencias en las condiciones experimentales, principalmente la temperatura (40°C heparina natural; 25°C **1**, **2**, **3**, y **4**).
- Este comportamiento “singular” de los residuos terminales **a** y **f** se mantiene para los hexasacáridos **2**, **3**, y **4**. Si comparásemos los datos de estos tres oligosacáridos sintéticos con los datos de la heparina natural, obviamente, para los residuos extremos tendríamos dos componentes superponiéndose: las variaciones debidas exclusivamente a los distintos patrones de sustitución, y,

las variaciones singulares debidas a las diferencias de longitud de la cadenas sacáridicas.

Manteniendo este razonamiento, para el análisis de la influencia de la sustitución se han empleado las diferencias de desplazamientos químicos, $\Delta\delta$, entre el compuesto de secuencia regular **1** (nuestro análogo de heparina) y los compuestos modificados **2**, **3**, y **4** (nuestros modelos de "derivados" de heparina) (figura 2.3.4). El estudio se ha clasificado según la sustitución del grupo funcional:

2-O-sulfatación de los anillos de L-iduronato: al comparar los residuos **a**, **c**, y **e** de los compuestos **3** y **1** (figura 2.3.4), se observa que la presencia de un grupo sulfato en la posición 2-IdoA induce, en el espectro de ^1H , un apreciable desplazamiento a campo alto de H-2 (en el rango $[(+0.66) \sim (+0.55)]$ ppm), y H-1 ($[(+0.25) \sim (+0.21)]$ ppm). Este comportamiento se explica por el efecto de retirada de electrones asociado con el grupo sulfato. En el espectro de carbono se observa un desplazamiento a campo alto de C-2 ($[(+7.6) \sim (+6.8)]$ ppm), y a campo bajo de C-1 ($[(-2.9) \sim (-1.7)]$ ppm). Éste último dato es comparable con la predicción en modelos teóricos de cálculo de desplazamientos químicos para el efecto de esta sustitución sobre los desplazamientos de ^{13}C : $\Delta\delta = +7.0, -3.4, \text{ y } +0.3$ ppm para los carbonos $\alpha, \beta, \text{ y } \gamma$, respectivamente⁴¹.

Por otro lado, este comportamiento se observa también en el caso del residuo **c** en el hexasacárido **2**, aunque con una variación mayor en protón (+0.66 ppm, +0.36 ppm, y +0.34 ppm, para H-2, H-1, y H-3 respectivamente), y menor en carbono (+5.9 ppm, para C-2). Para este residuo no sólo se debe tener en cuenta la ausencia del grupo sulfato, sino también la presencia de un grupo acetamido en el residuo de D-glucosamina de su extremo no reductor. Datos recogidos en la bibliografía⁴² indican que dicho grupo acetamido puede ejercer alguna influencia sobre las conformaciones de anillos adyacentes de ácido L-idurónico sulfatados en **2**. En este sentido, los datos de constantes de

acoplamiento indican un desplazamiento de poblaciones de conformeros en este anillo respecto de **1**, que se discute en un apartado posterior de este capítulo.

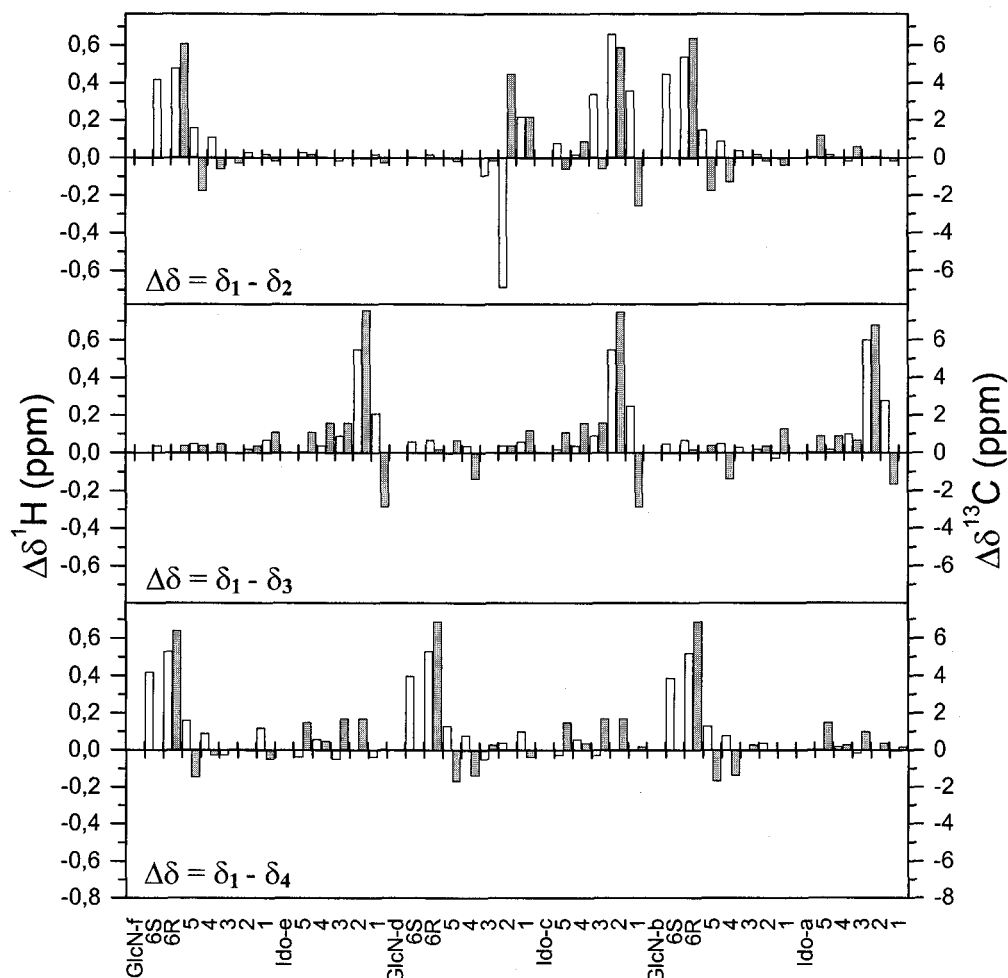


Figura 2.3.4 Incrementos de desplazamientos químicos $\Delta\delta$ (ppm) de ^1H (eje de ordenadas izquierdo, columnas claras), y de ^{13}C (eje de ordenadas derecho, columnas oscuras), de **2**, **3**, y **4**, relativos a **1**.

6-O-sulfatación de los anillos de D-glucosamina: El efecto, similar al descrito anteriormente, se hace patente a través de la comparación de desplazamientos de estos residuos en **4**, y los residuos **b** y **f** de **2**, frente a **1**. Así, los protones H-6 y H-6' sufren en promedio un desplazamiento importante a

campo alto (+0.52 ppm, y +0.42 ppm, respectivamente), así como un considerable desplazamiento en la misma dirección de C-6 (+6.5 ppm), en el espectro de ^{13}C . Esto es, nuevamente, consecuencia del efecto inductivo negativo del grupo sulfato. También sufre una variación apreciable el protón H-5 (+0.14 ppm en **4** y +0.15 ppm en **2**).

N-sulfatación vs. N-acetilación (D-glucosamina d en 2): en el espectro de ^1H , se observa una fuerte variación a campo bajo de la señal H-2d (-0.69 ppm), consecuencia del fuerte efecto desapantallante que ejerce el grupo acetamido sobre dicho protón. También se produce una variación menor, en el mismo sentido, en H-3d (-0.10 ppm), y un desplazamiento a campo alto en la señal correspondiente a H-1d (+0.22 ppm). En el espectro de ^{13}C , las señales C-1d y C-2d experimentan desplazamientos a campo alto (+2.2 y +4.5 ppm, respectivamente).

Curiosamente, se han podido observar efectos a “largo alcance” de la sustitución sobre los desplazamientos químicos, relacionando las posiciones 2-IdoA y 6-GlcN, en secuencias disacarídicas IdoA- GlcN. Por un lado, la sulfatación en la posición 2-IdoA produce un desapantallamiento de los protones H-6 de la GlcN precedente. Por otro, se puede apreciar un desplazamiento a campo bajo de las señales C-2 y C-3 del anillo de IdoA posterior a los residuos de D-glucosamina 6 sulfato. Estas variaciones sugieren algún tipo de relación entre estas posiciones que, según los datos estructurales⁴³, se encuentran próximas en el espacio.

En resumen, el análisis de las variaciones de desplazamientos químicos como consecuencia de la modificación en el patrón de sustitución de **2**, **3**, y **4**, frente a **1**, da resultados directamente comparables y compatibles con los datos existentes para las comparaciones de polisacáridos químicamente modificados de heparina frente al polisacárido regular natural^{33,34}. Por lo tanto, disponemos de un modelo aditivo que, sobre los valores del modelo regular, que considera los efectos de “borde”, añade el efecto de la sustitución, modelo que podría ser

empleado en estudios de futuros derivados sintéticos. Por otro lado, esta similitud “polisacáridos – oligosacáridos” sugiere que este conjunto de derivados obtenidos mediante síntesis química son candidatos adecuados para ser utilizados como modelos estructurales y espectroscópicos de los polímeros naturales. Es importante destacar, asimismo, el interés de poder disponer de productos de estructura química definida y que soslayen los inconvenientes que, desde el punto de vista espectroscópico, produce la naturaleza polimérica, y que, a su vez, conserven las propiedades de los productos naturales.

2.3.2 ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y LA DINÁMICA MOLECULAR POR RMN

Con relación a los estudios de la estructura tridimensional de carbohidratos, para la mayoría de los oligosacáridos la geometría molecular global viene definida principalmente por los valores adoptados por los ángulos diedros glicosídicos Φ y Ψ . No obstante, la validez de la afirmación anterior se apoya en el postulado de que los anillos de azúcar constituyentes son relativamente rígidos, normalmente en conformaciones estables de silla, en el caso de hexopiranosas. En el presente estudio, sin embargo, se debe tener en cuenta que dicha geometría global, y, por lo tanto, la distribución espacial de los grupos funcionales a lo largo de la estructura molecular, puede estar influenciado no sólo por las torsiones glicosídicas Φ y Ψ , sino también por las conformaciones que adopten los anillos flexibles de ácido L-idurónico.

2.3.2.1 Estructura molecular interna. Equilibrio conformacional de los anillos de L-iduronato. Estudio de las constantes de acoplamiento $^3J_{H,H}$.

El primer paso en el estudio conformacional, por tanto, consistió en la caracterización del equilibrio de conformeros específico de los residuos de L-iduronato. De nuevo, el interés de este estudio se centró en esclarecer si los distintos patrones de sustitución en los oligosacáridos pueden tener algún efecto sobre dicho equilibrio conformacional. En primer lugar, cabe destacar que en los espectros monodimensionales de ^1H -RMN, tal como se muestra en la **figura**

2.3.5, para cada uno de los oligosacáridos, las señales correspondientes a los anillos de L-iduronato se presentan, de forma característica, ligeramente ensanchadas, con poca resolución, en comparación con las señales de los anillos de D-glucosamina, para las que sí es posible observar su multiplicidad.

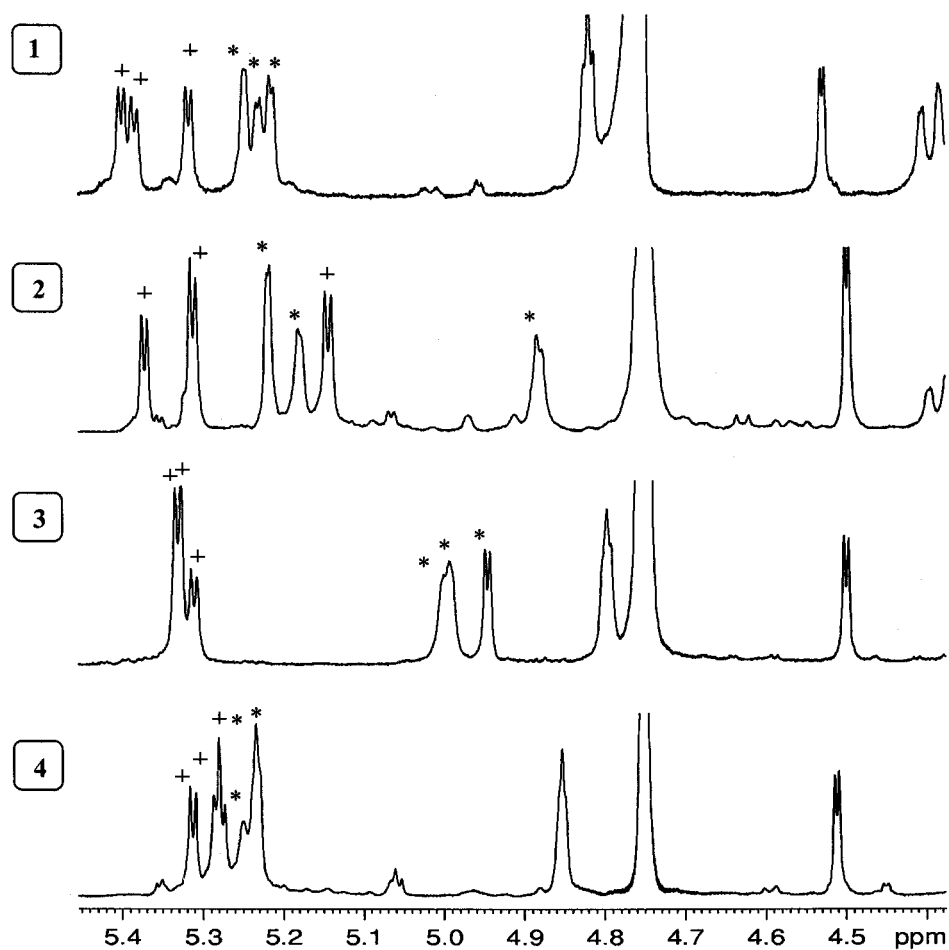


Figura 2.3.5 Ampliación de la zona de anoméricos de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 25 °C) de 1, 2, 3, y 4. Las señales de los protones anoméricos de L-iduronato están marcadas con *, los anoméricos de D-glucosamina con +.

Este ensanchamiento de líneas característico de los residuos de L-iduronato puede ser atribuido, inicialmente, a la contribución de intercambio a T_2^* como consecuencia del equilibrio multiconformacional de dichos anillos. No obstante no se pueden descartar otro tipo de contribuciones, como, por ejemplo, interacciones con trazas de cationes paramagnéticos, ya que, como se describe en el capítulo 4, son precisamente los anillos de L-iduronato los residuos implicados principalmente en la interacción “localizada” con determinados tipos de cationes, y, por lo tanto, los que sufrirían mayoritariamente los efectos de tales interacciones.

Para el estudio por RMN del carácter policonformacional de estos residuos son las constantes de acoplamiento vecinales $^3J_{H,H}$ las que mayor información nos ofrecen, ya que cambios en la geometría del anillo suponen importantes variaciones en los ángulos diedros H-C-C-H endocíclicos. Hay que destacar que el elevado solapamiento de señales, así como el característico ensanchamiento de las señales de L-idurónico, dificultan considerablemente su evaluación directa mediante el análisis del desdoblamiento de líneas en los espectros monodimensionales. De esta forma, la metodología elegida para la obtención de las constantes $^3J_{H,H}$ ha sido la deconvolución recursiva en el dominio de frecuencias de los picos de cruce DQF-COSY⁴⁴. De esta forma, al analizar espectros bidimensionales, por un lado se resuelve el problema de la dispersión de señales, y, por otro, se obtiene la ventaja adicional de que esta metodología permite la obtención de $^3J_{H,H}$ de forma precisa incluso en aquellos casos en los que pueda existir cancelación parcial de señales de signos opuestos⁴⁴.

En la **tabla 2.3.3** se recogen los valores de las constantes de acoplamiento vecinales $^3J_{H,H}$, para los anillos de L-iduronato en **1**, **2**, **3**, y **4**, obtenidos como se ha mencionado anteriormente.

Idurónico	Hexa	${}^3J_{1,2}$	${}^3J_{2,3}$	${}^3J_{3,4}$	${}^3J_{4,5}$
a	1	3.4	--	3.4	2.9
	2	2.9	5.3	3.7	2.7
	3	3.2	5.1	3.9	2.9
	4	2.5	4.8	3.6	2.8
c	1	2.9	5.6	3.9	2.7
	2	3.6	6.5	4.1	3.5
	3	2.1	5.4	4.2	2.5
	4	3.6	4.3	4.5	3.7
e	1	2.7	5.7	3.5	2.8
	2	2.8	5.9	4.0	3.1
	3	2.1	5.4	4.2	2.5
	4	3.6	4.2	3.6	3.5

Tabla 2.3.3 Constantes de acoplamiento experimentales [${}^3J_{H,H}$ (Hz)] para los residuos de L-iduronato en los hexasacáridos sintéticos 1, 2, 3, y 4. (D_2O , 25 °C)

Se han calculado las curvas tipo Karplus teóricas para los acoplamientos vecinales de los anillos de L-iduronato, mediante la aplicación de la ecuación obtenida por Altona⁴⁵ (figura 2.3.6). La tabla 2.3.4 muestra los valores de ${}^3J_{H,H}$ teóricos para las tres conformaciones energéticamente favorables, 1C_4 , 4C_1 , y 2S_0 . Para las distintas conformaciones canónicas, los valores de las torsiones H-C-C-H fueron obtenidos a partir de cálculos de mecánica molecular sobre un modelo monosacarídico de ácido L-idurónico por minimización de la energía potencial molecular respecto a todos los grados de libertad.

	IdoA·2OSO ₃ †			IdoA‡		
	1C_4	4C_1	2S_0	1C_4	4C_1	2S_0
${}^3J_{1,2}$	2.1	7.9	6.9	2.2	7.9	7.1
${}^3J_{2,3}$	3.0	10.0	10.4	3.1	10.0	10.4
${}^3J_{3,4}$	2.9	9.9	6.8	3.0	9.9	6.6
${}^3J_{4,5}$	1.0	4.5	3.0	1.0	4.4	3.4

Tabla 2.3.4 Constantes de acoplamiento teóricas [${}^3J_{H,H}$ (Hz)] para modelos canónicos de L-iduronato en conformación de silla y bote torcido. † ácido L-idurónico sulfatado en 2. ‡ ácido L-idurónico.

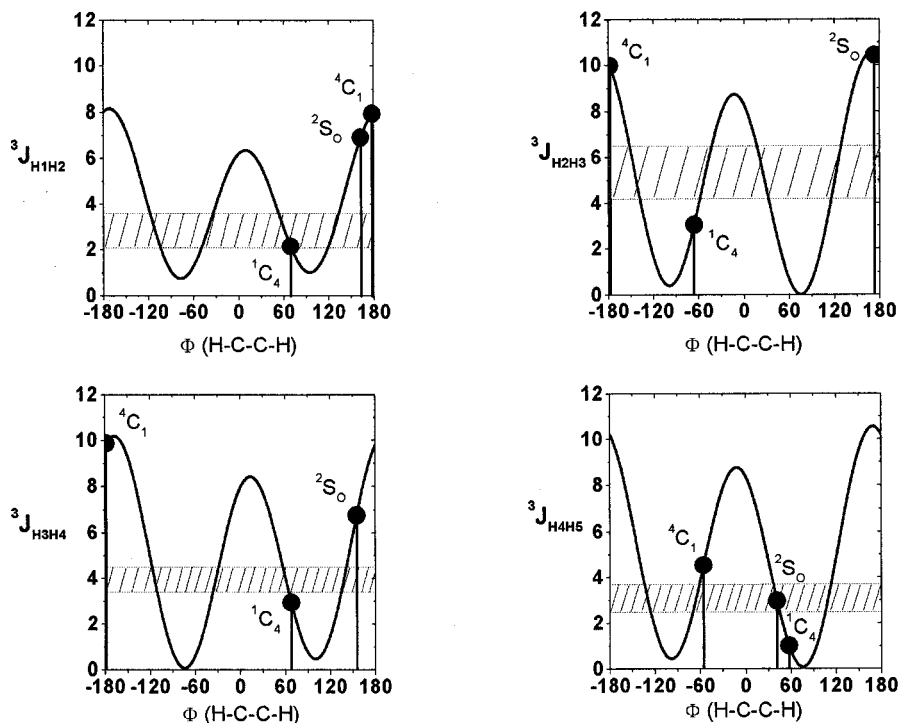


Figura 2.3.6 Curvas Karplus-Altona para un anillo de L-iduronato. Los círculos representan los valores de las conformaciones canónicas. El área rallada encierra el rango de $^3J_{H,H}$ encontrado experimentalmente para 1, 2, 3, y 4.

Al igual que en los casos de los glicosaminoglicanos que contienen L-iduronato descritos en la bibliografía, los valores de las constantes de acoplamiento experimentales (tabla 2.3.3) no pueden ser interpretados adscribiéndolos a una simple conformación de silla 1C_4 o 4C_1 (tabla 2.3.4 y figura 2.3.6). Además, tal y como ocurre para la heparina natural y derivados, para cada uno de los anillos de L-iduronato en los 4 hexasacáridos se observa el NOE intrarresidual entre los protones H-2 y H-5 (figura 2.3.7), indicando claramente que la conformación de bote torcido 2S_0 debe contribuir en un porcentaje considerable al equilibrio conformacional anular, ya que ambos protones están espacialmente próximos de forma exclusiva en dicha conformación (figura 2.3.8).

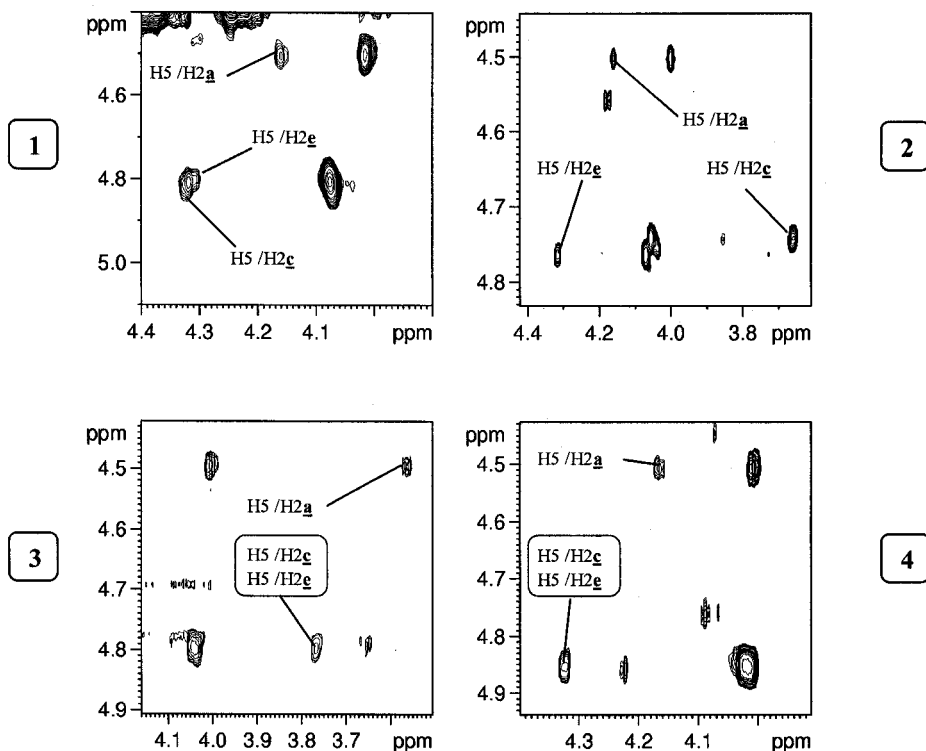


Figura 2.3.7 NOEs intraanulares H2-H5 observados para los tres residuos de ácido L-idurónico en cada uno de los hexosacáridos 1, 2, 3, y 4. Experimentos NOESY (tiempo de mezcla 400 ms), a 500 MHz (1,3, y 4) y a 800 MHz (2). (D₂O, 25 °C).

Es decir, para el análisis de las constantes de acoplamiento es necesario tener en cuenta, al menos, las tres conformaciones canónicas ¹C₄, ⁴C₁, y ²S₀ (figura 2.3.8).

Para el estudio de los equilibrios entre estas tres conformaciones de los anillos de L-iduronato, las constantes de acoplamiento vecinales ³J_{H2,H3} y ³J_{H3,H4} cobran un interés especial. Estas constantes son similares para la conformación ⁴C₁ (~10 Hz) (tabla 2.3.4), y también similares, aunque mucho más pequeñas, para la conformación ¹C₄ (~3 Hz), pero difieren considerablemente para la conformación ²S₀ (~10.4, ~6.7, respectivamente). Por lo tanto, una contribución considerable de la conformación ²S₀ a dicho equilibrio, se deberá ver reflejada por una diferencia marcada entre dichas constantes de acoplamiento⁴².

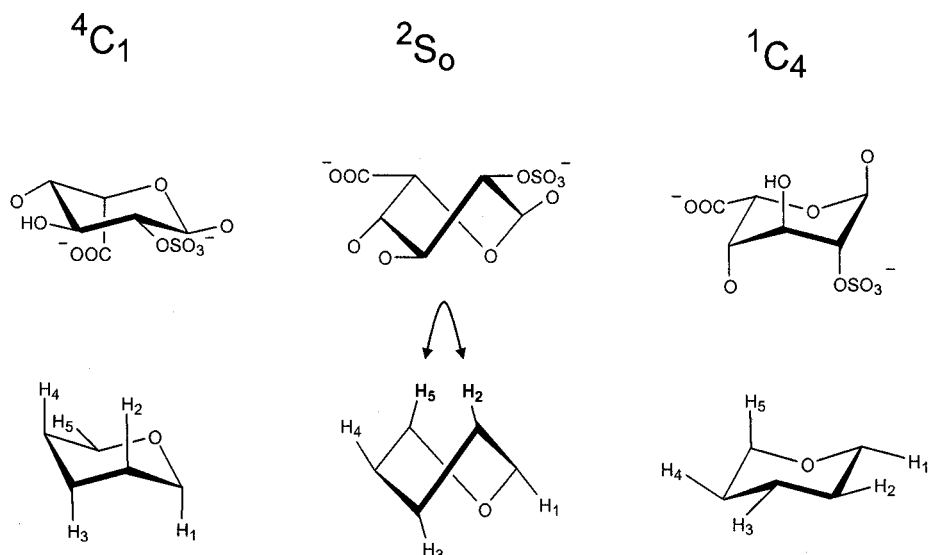


Figura 2.3.8 Conformaciones canónicas energéticamente favorables para los residuos de *L*-iduronato. Se muestran las disposiciones relativas de grupos sustituyentes (fig. superior) y de los protones (fig. inferior). En la figura inferior se muestra el NOE intrarresidual exclusivo de la conformación 2S_0 .

De esta forma, en términos cualitativos, una inspección general de los valores recogidos en las **tablas 2.3.3** y **2.3.4** sugiere una contribución importante de la conformación de silla 1C_4 , ya que en general los valores de ${}^3J_{H,H}$ son pequeños, lo que, por otro lado, indica una participación despreciable de la conformación 4C_1 . La contribución de la silla 1C_4 se confirma, además, por la detección de picos de cruce COSY correspondientes a los acoplamientos a 4 enlaces ${}^4J_{H1,H3}$ y ${}^4J_{H2,H4}$, indicando una disposición espacial plana en "W" de los enlaces que unen dichos núcleos característica de dicha conformación de silla (**figura 2.3.7**). No obstante, para ningún residuo, la serie de valores se puede adscribir a una población 100 % de 1C_4 , especialmente si se tienen en cuenta los valores de ${}^3J_{H2,H3}$ y ${}^3J_{H3,H4}$.

El cálculo de las poblaciones de conformeros correspondientes a cada residuo se llevó a cabo mediante el ajuste por mínimos cuadrados entre los valores ${}^3J_{H,H}$ obtenidos teóricamente para una mezcla de los tres conformeros y

los valores ${}^3J_{H,H}$ experimentales. En este procedimiento matemático, los coeficientes de mezcla (poblaciones) de cada conformero son los parámetros a ajustar.

Idurónico		1	2	3	4
a	1C_4	72 (± 2.4)	67 (± 1.7)	72 (± 1.0)	78 (± 1.3)
	2S_0	28 (± 0.9)	33 (± 0.6)	28 (± 0.3)	22 (± 0.4)
	χ^2	2.1	1.9	0.8	1.2
c	1C_4	69 (± 1.2)	55 (± 1.2)	75 (± 1.3)	71 (± 2.1)
	2S_0	31 (± 0.4)	45 (± 0.4)	25 (± 0.4)	29 (± 0.7)
	χ^2	0.9	1.2	1.4	2.7
e	1C_4	70 (± 1.5)	66 (± 1.2)	75 (± 1.3)	76 (± 1.9)
	2S_0	30 (± 0.5)	34 (± 0.4)	25 (± 0.4)	24 (± 0.6)
	χ^2	1.3	1.0	1.4	2.3

Tabla 2.3.5 Poblaciones de conformeros (%) obtenidas por ajuste matemático entre las constantes de acoplamiento experimentales y las teóricas, para los residuos de L-iduronato.

Siguiendo esta metodología, y en concordancia con los datos existentes en la bibliografía para residuos internos de L-iduronato en los polisacáridos naturales, se pudo descartar la participación de la conformación de silla 4C_1 . En todos los cálculos, para cada uno de los hexasacáridos, su inclusión en el ajuste matemático no solamente indicaba una población como máximo de un 3 %, en el mejor de los casos, sino que su eliminación del cálculo producía una disminución de al menos una unidad en el valor de la desviación cuadrática media de dicho ajuste (χ^2). La **tabla 2.3.5** muestra los resultados de dicho ajuste, en el que se consideraron, pues, solamente las conformaciones 1C_4 y 2S_0 .

Las constantes de acoplamiento esperadas para estas poblaciones se muestran en la **tabla 2.3.6**.

Idurónico	Hexa	${}^3J_{1,2}$	${}^3J_{2,3}$	${}^3J_{3,4}$	${}^3J_{4,5}$
a	1	3.5 (3.4)	--	4.0 (3.4)	1.6 (2.9)
	2	3.7 (2.9)	5.5 (5.3)	4.2 (3.7)	1.7 (2.7)
	3	3.6 (3.2)	5.2 (5.1)	4.0 (3.9)	1.7 (2.9)
	4	3.2 (2.5)	4.6 (4.8)	3.8 (3.6)	1.4 (2.8)
c	1	3.6 (2.9)	5.3 (5.6)	4.1 (3.9)	1.6 (2.7)
	2	4.4 (3.6)	6.4 (6.5)	4.6 (4.1)	2.1 (3.5)
	3	3.4 (2.1)	4.9 (5.4)	3.9 (4.2)	1.6 (2.5)
	4	3.5 (3.6)	5.1 (4.3)	4.0 (4.5)	1.6 (3.7)
e	1	3.5 (2.7)	5.2 (5.7)	4.1 (3.5)	1.6 (2.8)
	2	3.8 (2.8)	5.6 (5.9)	4.2 (4.0)	1.7 (3.1)
	3	3.4 (2.1)	4.9 (5.4)	3.9 (4.2)	1.6 (2.5)
	4	3.3 (3.6)	4.9 (4.2)	3.9 (3.6)	1.5 (3.5)

Tabla 2.3.6 Constantes de acoplamiento teóricas [${}^3J_{H,H}$ (Hz)] para los residuos de L-iduronato en los hexasacáridos sintéticos 1, 2, 3, y 4. Entre paréntesis: ${}^3J_{H,H}$ experimentales (tabla 2.3.3)

El acuerdo con las obtenidas experimentalmente (tabla 2.3.3) es bastante aceptable, especialmente respecto a las constantes ${}^3J_{H2,H3}$ y ${}^3J_{H3,H4}$, que, como se expresó anteriormente, son las que más información contienen respecto al equilibrio conformacional. Por otro lado, las mayores discrepancias se producen fundamentalmente en los valores de ${}^3J_{H4,H5}$ y ${}^3J_{H1,H2}$, lo que es consecuencia de que los efectos de la electronegatividad de los grupos iónicos no están suficientemente bien parametrizados en la ecuación de Altona, especialmente en el caso del grupo carboxilato en la posición 5 (${}^3J_{H4,H5}$).

Los resultados de poblaciones (tabla 2.3.5) indican:

- La localización a lo largo de la secuencia no influye en el equilibrio conformacional. Para 1, 3, y 4, no se observan variaciones importantes en las poblaciones, si la comparación se realiza a lo largo de la secuencia de un determinado oligosacárido (70-75% 1C_4 : 25-30 % 2S_0). Esto, además, confirma que el grupo isopropilo en el terminal reductor simula bastante bien la región C3-C4-C5 de un residuo de azúcar, puesto que previene los conocidos efectos de "borde" que se han descrito para los anillos de L-

iduronato situados en el extremo reductor de los oligosacáridos tipo heparina, en los que el equilibrio conformacional es más extenso, incluyendo la conformación 4C_1 .

- Más interesante aún es que tampoco se deriva ningún cambio significativo en las poblaciones conformacionales como consecuencia de la sulfatación o no de la posición 2 del anillo, como se deduce comparando los residuos de L-iduronato **a,c**, y **e**, de los hexasacáridos **1** y **3**, ó **3** y **4**.
- La única diferencia destacable, entre los distintos residuos de los 4 hexasacáridos se aprecia en el caso del L-iduronato **c** del hexasacárido **2**. En este caso, la conformación 2S_0 aumenta su contribución hasta un 45 %.

Esta variación de población observada en el residuo **c** se refleja, a su vez, en los datos de desplazamiento químico de ${}^{13}C$ (Tabla 2.3.2). Así, si comparamos los anillos de L-iduronato **c** de **2** y de **3**, que son equivalentes, en términos de patrón de sustitución en 2 y de posición a lo largo de la cadena oligosacáridica, se observa un desplazamiento a campo bajo en los carbonos C-2, C-3, C-4, y C-5 en **2** (-1.6, -2.2, -0.7, -1.7 ppm, respectivamente). Esto es consistente con las conclusiones obtenidas por van Boeckel et. al⁴², es decir, que un aumento en la conformación de bote torcido, lleva asociado una variación a campo bajo de las señales de ${}^{13}C$, al aumentar el número de residuos en disposición pseudoecuatorial.

Es interesante destacar que, como se ha mencionado, la ausencia del grupo sulfato en la posición 2 no parece ser responsable de un cambio conformacional del anillo. De esta forma, una justificación para el comportamiento conformacional del residuo **c** de **2** la podemos encontrar en el efecto del grupo acetamido de la glucosamina adyacente, característica singular que diferencia a éste residuo de los restantes. El efecto del grupo acetamido sobre las conformaciones del anillo de L-iduronato más próximo en el espacio ha sido estudiado con anterioridad en heparinas químicamente modificadas^{42,43}.

Concretamente el desplazamiento del equilibrio conformacional favoreciendo el bote torcido 2S_0 , como una consecuencia del grupo acetamido adyacente, ha sido observado en el caso de un trisacárido sintético (**figura 2.3.9**) cuyo residuo central es un anillo de L-iduronato sin sulfato en la posición 2⁴². Las poblaciones que se obtienen a partir de las constantes de acoplamiento⁴⁶ indican una población aproximadamente 50:50 de 1C_4 y 2S_0 , acorde con nuestros resultados.

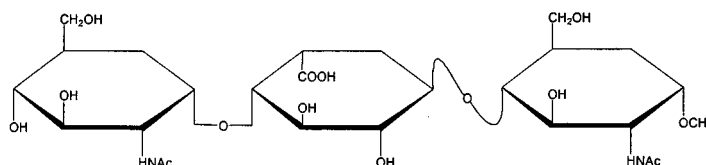


Figura 2.3.9 Trisacárido sintético modelo de heparina, que se recoge en la bibliografía⁴². El anillo de L-iduronato central presenta poblaciones iguales de 2S_0 y de 1C_4 .⁴⁶

2.3.2.2 Estructura molecular global. Análisis cualitativo: patrón de NOEs interglucosídicos.

En la definición de la estructura tridimensional de estos oligosacáridos, el siguiente aspecto clave a considerar es la geometría de los enlaces glicosídicos. Es decir, qué valores adoptan mayoritariamente los ángulos de torsión glicosídicos Φ y Ψ .

Para toda la discusión que se lleva a cabo a lo largo de este apartado y del siguiente, conviene resaltar que, estrictamente, el único hexasacárido sintético directamente comparable con los datos de heparina natural³³ es el producto sintético **1**, que representa la región regular de sulfatación. Los restantes productos tienen patrones de sulfatación o bien asimétricos (**2**), o bien simétricos pero con niveles de sulfatación inferiores a los de dicha región regular (**3** y **4**), (modelos de "sulfatos de heparano"). Por lo tanto, la estrategia que se sigue en estos apartados va a ser similar a la seguida en el estudio de desplazamientos químicos (**apartado 2.3.1.3**), es decir, realizar una comparación directa de los datos estructurales de nuestro modelo **1** con los de la heparina

natural, y, posteriormente, comparar los parámetros estructurales de los restantes hexasacáridos con los de éste, teniendo en cuenta, de esta forma, la similitud de tamaños entre los 4 modelos sintéticos.

En la **tabla 2.3.6** se recogen los picos de cruce interglucosídicos (NOEs) que se observan en los espectros NOESY de **1**, **2**, **3**, y **4**. Se han incluido tanto los NOEs interglucosídicos intensos, como aquellos de intensidad mucho menor, marcados como "d" (débiles).

Unión glicosídica	1	2	3	4
f – e	H1' – H3	H1' – H3	H1' – H3	H1' – H3
	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4
		H5' – H4	H5' – H4 (d)	H5' – H4 (d)
e – d	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4
	H1' – H6proR	H1' – H6proR	H1' – H6proR	H1' – H6proR [†]
	H1' – H6proS (d)	H1' – H6proS (d)	H2' – H6proR	H2' – H6proR [†]
	H5' – H3 (d)	H5' – H3 (d)	H1' – H6proS (d)	
			H5' – H3 (d)	
d – c	H1' – H3	H1' – H3	H1' – H3	H1' – H3
	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4
		H5' – H4		H5' – H4
c – b	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4
	H1' – H6proR	H1' – H6proR	H1' – H6proR	H1' – H6proR [†]
	H1' – H6proS (d)	H1' – H6proS (d)	H2' – H6proR	H2' – H6proR [†]
	H5' – H3 (d)		H1' – H6proS (d)	
			H2' – H6proS (d)	
		H5' – H3 (d)		
b – a	H1' – H3	H1' – H3	H1' – H3	H1' – H3
	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4	H1' – H4
		H5' – H4		H5' – H4

Tabla 2.3.7 NOEs interglucosídicos observados para **1**, **2**, **3**, y **4**. Los picos marcados con (d) se observan débilmente. [†] La asignación de este pico se hizo por analogía con **1**, **2**, y **3**, ya que H6proR y H6proS aparecen solapados.

El análisis del patrón de NOEs interglucosídicos recogidos en dicha tabla pone de manifiesto que los NOEs que caracterizan a un determinado tipo de

unión glicosídica son esencialmente los mismos (“*L-IdoA*→*D-GlcN*”: H1'-H4 y H1'-H3)(“*D-GlcN*→*L-IdoA*”: H1'-H4 y H1'-H6_{proR}) tanto si comparamos los distintos enlaces glicosídicos que encontramos a lo largo de un sólo hexasacárido, como si comparamos todas las uniones que encontramos en **1**, **2**, **3**, y **4**. Además, el patrón de NOEs de **1** es análogo al que se obtiene para la heparina natural^{33,43}.

Más importante aún es que la comparación con las predicciones de los mapas relajados (Φ, Ψ) obtenidos mediante cálculos de mecánica molecular (capítulo 3), permite descartar la participación de disposiciones (Φ, Ψ) del tipo *anti-Ψ*, para todos los tipos de uniones glicosídicas presentes, mediante el estudio de NOEs exclusivos. Así, de acuerdo con los mapas, la contribución de un mínimo *anti-Ψ* al equilibrio conformacional (Φ, Ψ) para las uniones de tipo “*D-GlcN*→*L-IdoA*” debería suponer la observación del NOE H5'-H3, independientemente de la conformación de silla o de bote torcido del anillo de *L*-iduronato. Por otro lado, para las uniones “*L-IdoA*→*D-GlcN*” deberíamos detectar un pico NOE correspondiente a H1'-H5. En ningún caso observamos dichos NOEs.

Es interesante destacar que, a pesar de que los oligosacáridos modelos de heparina presentan estructuras lineales extendidas⁴⁷, en el caso de **1**, **2**, **3**, y **4**, se detectan picos que se corresponden con NOEs a “largo” alcance. Concretamente, para las uniones *D-GlcN*→*L-IdoA* se observa el NOE H5'-H4, que según los mapas energéticos (Φ, Ψ) es predecible para una geometría *syn-Ψ*. Este NOE no se puede detectar para algunos (**1**, y las uniones “**d-c**” y “**b-a**” de **3**) debido al solapamiento de señales en dicha región. Más interesante resultan los NOEs de las uniones *L-IdoA*→*D-GlcN*, ya que se pueden observar varios NOEs de largo alcance (H1'-H6_{proR}, H1'-H6_{proS}, H2'-H6_{proR}, H2'-H6_{proS} y H5'-H3). Estos NOEs están de acuerdo, de nuevo, con una situación *syn-Ψ*. Para los NOEs H1'-H6_{proS} y H2'-H6_{proS} no se puede descartar una contribución importante de la difusión de espín.

Los NOEs $H5'-H3$ y $H2'-H6_{proR}$ de las uniones $L-IdoA \rightarrow D-GlcN$, nos ofrecen, además, información estructural indirecta del estado conformacional del anillo de L-idurónico implicado. El estudio de los mínimos energéticos de los mapas relajados (capítulo 3) pone de manifiesto que dichos NOEs solamente son compatibles con la situación en la que la conformación del anillo de L-IdoA es de silla 1C_4 , ya que en el caso del bote torcido 2S_0 , ambos protones están bastante alejados. De esta forma, la detección de este NOE constituye un dato más de la contribución de dicha silla al equilibrio conformacional. En la **figura 2.3.10**, se muestra un ejemplo de los dos mínimos energéticos absolutos para la unión $L-IdoA \cdot 2OSO_3 \rightarrow D-GlcNSO_3 \cdot 6OSO_3$, presente en el hexasacárido **1**, aunque el anterior razonamiento es aplicable a todas las uniones $L-IdoA \rightarrow D-GlcN$ presentes en los 4 hexasacáridos.

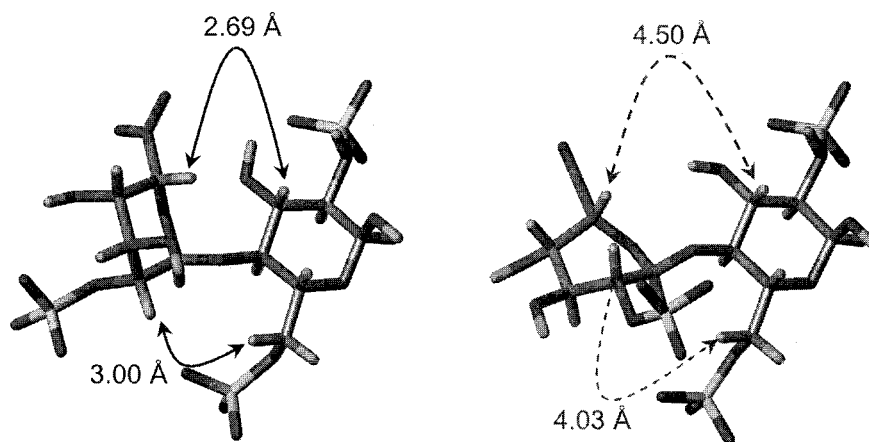


Figura 2.3.10 Mínimos energéticos para la unión " $L-IdoA \cdot 2OSO_3 \rightarrow D-GlcNSO_3 \cdot 6OSO_3$ ". Se representan las distancias $H5'-H3$ y $H2'-H6_{proR}$.

De todo lo anterior se deduce que el patrón de NOEs interglucosídicos observado experimentalmente, en concordancia con estudios previos, sobre heparina³³ y derivados⁴⁹, indica una disposición mayoritariamente $syn-\Psi$ para todos los enlaces glicosídicos. Dicho patrón de NOEs se muestra esquemáticamente en la **figura 2.3.11**, considerando, por simplicidad, solamente la conformación 1C_4 para los residuos de L-iduronato.

Estos resultados son análogos a los obtenidos por Mulloy et al. para la heparina natural⁴³, y por Mikhailov et al. para un hexasacárido derivado de heparina. Estos autores, describen la geometría molecular global como una hélice a derechas en la que cada esqueleto disacarídico “*D-GlcN* → *L-IdoA*” se repite por una operación de simetría consistente en un giro de aproximadamente 180 °, seguido de una traslación de unos 8 Å.

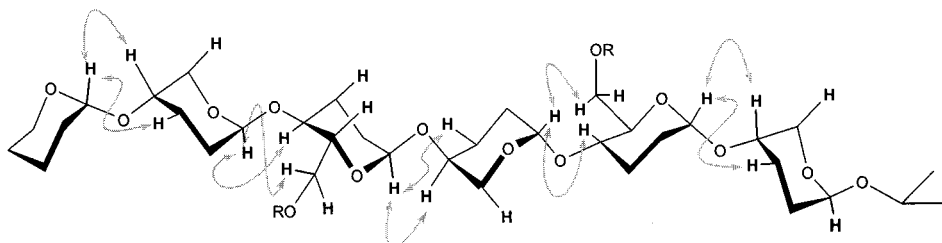


Figura 2.3.11 Esqueleto molecular general compartido por los oligosacáridos 1, 2, 3, y 4. Las flechas indican los NOEs interglicosídicos que se observan para los 4 hexasacáridos.

Cualitativamente, podemos concluir, pues, que:

- La disposición geométrica de cada tipo de torsión glicosídica está bastante bien definida en estas moléculas, no existiendo equilibrios conformacionales (Φ, Ψ) que provoquen variaciones considerables del ángulo diedro Ψ .
- La conformación global, o mayoritaria, de los enlaces glicosídicos en estos glicosaminoglicanos, es del tipo *syn-Ψ*, y es independiente del patrón de sulfatación de sus residuos constituyentes, siendo otros los efectos que gobiernan la disposición de dichas torsiones (efectos estereoelectrónicos).
- El patrón de NOEs es compatible con una geometría molecular global de hélice a derechas, similar a la descrita para la heparina natural.

2.3.2.4 Constantes de velocidad de relajación cruzada longitudinal homonuclear (σ_{ij}^{NOE}). Análisis cuantitativo de la estructura molecular global.

El análisis cualitativo anterior nos permite atribuir una estructura global helicoidal equivalente a todos los oligosacáridos sintéticos 1-4 y similar a la del polisacárido natural. Estas conclusiones se fundamentan esencialmente en la comparación con el patrón de NOEs observado en la heparina³³, así como en la ausencia de picos NOE exclusivos de otras posibles disposiciones de los enlaces glicosídicos (*anti-Ψ*). Sin embargo este tipo de análisis sólo ofrece información acerca de la proximidad espacial de determinadas zonas de la molécula, pero no permite generar estructuras de alta resolución, que deben incluir datos de distancias interprotónicas. Un estudio cuantitativo del grado de concordancia estructural de los oligosacáridos modelos 1-4 entre sí y respecto a la heparina natural, que permita distinguir pequeñas diferencias de comportamiento que pudieran resultar del diferente patrón de sustitución, requiere, por lo tanto, la evaluación de las distancias interprotónicas implícitas en las medidas de NOE. En el caso de los carbohidratos estos estudios suelen combinar las distancias experimentales y los cálculos de modelización molecular.

Como ya se ha indicado, las distancias interprotónicas r_{ij} se pueden obtener a partir de las constantes de velocidad de relajación cruzada longitudinal σ_{ij}^{NOE} . En nuestro caso, las σ_{ij}^{NOE} se obtuvieron experimentalmente a partir de las curvas de crecimiento del volumen normalizado del NOE en experimentos NOESY con tiempos de mezcla variables (típicamente entre 100 y 600 ms), para cada uno de los oligosacáridos 1-4 a distintas frecuencias de espectrómetro (500 y 400 MHz para 1-4; además, 800 MHz para 2) (véase parte experimental).

En las **tablas 2.3.8** y **2.3.9** se recogen los valores de σ_{ij}^{NOE} correspondientes a los vectores interglicosídicos que caracterizan la uniones “*D-GlcN*→*L-IdoA*” y “*L-IdoA*→*D-GlcN*”, respectivamente. Para cada unión, se calcularon las σ_{ij}^{NOE} correspondientes a los NOEs interglicosídicos a “corto”

alcance, ya que son las distancias obtenidas a partir de éstos las que van a definir, principalmente, la geometría del enlace glicosídico. Además, en general, los NOEs a “largo” alcance son débiles, y el cálculo de la σ_{ij}^{NOE} a partir de la curva de crecimiento se ve afectado por un error considerable, debido a la baja relación señal/ruido que presentan sus picos de cruce. Las curvas de crecimiento del NOE se midieron a varias intensidades de campo magnético con el objetivo de obtener tiempos de correlación específicos para las distintas parejas de protones (τ_{ij}), que nos diesen información acerca de la dinámica de reorientación de dichas moléculas en disolución.

Unión	Hexa	400 MHz		500 MHz		800 MHz	
		H1'-H4	H1'-H3	H1'-H4	H1'-H4	H1'-H4	H1'-H3
f - e	1	-0.10	-0.07	-0.12	-0.09		
	2	-0.09	-0.06	-0.11	-0.08	-0.18	-0.10
	3	-0.11	-0.16*	-0.13	-0.22*		
	4	-0.12*	-0.09*	-0.15*	-0.11*		
d - c	1	-0.15	-0.10	-0.16	-0.12		
	2	-0.05	-0.07	-0.09	-0.19	-0.14	-0.26
	3	-0.08	-0.20	-0.14	-0.29		
	4	-0.12*	-0.09*	-0.15*	-0.11*		
b - a	1	-0.12	-0.07	-0.13	-0.08		
	2	-0.08	-0.06	-0.10	-0.07	-0.16	-0.10
	3	-0.08	-0.16*	-0.10	-0.22*		
	4	-0.08	-0.06	-0.12	-0.07		

* promedio de varios residuos equivalentes.

Tabla 2.3.8 Valores experimentales de σ^{NOE} (s^{-1}) para las uniones glicosídicas “*D*-glucosamina \rightarrow *L*-iduronato” de 1, 2, 3, y 4, a 400 y 500 MHz. (D_2O , 25 °C). Se da σ^{NOE} a 800 MHz para el compuesto 2.

El error asociado a las medidas de σ_{ij}^{NOE} se pudo estimar en un valor en promedio de $0.01 s^{-1}$, por lo que todos los datos se han redondeado a 2 cifras decimales significativas. Los valores marcados con asterisco corresponden a picos de cruce para los cuales la integración del volumen no se pudo llevar a

cabo de forma independiente para cada residuo, como consecuencia del solapamiento de señales. Dichos picos se integraron conjuntamente, por lo que representan un valor promediado para varios residuos equivalentes.

Unión	Hexa	400 MHz	500 MHz	800 MHz
		H1' - H4	H1' - H4	H1' - H4
e - d	1	-0.09	-0.12	
	2	-0.13	-0.14	-0.16
	3	-0.14*	-0.17*	
	4	-0.14*	-0.17*	
c - b	1	-0.12	-0.13	
	2	-0.13	-0.14	-0.18
	3	-0.14*	-0.17*	
	4	-0.14*	-0.17*	

* promedio de varios residuos equivalentes

Tabla 2.3.9 Valores experimentales de σ^{NOE} (s^{-1}) para las uniones glicosídicas "L-iduronato \rightarrow D-glucosamina" de 1, 2, 3, y 4, a 400, 500. Para 2 se da también el valor a 800 MHz. (D_2O , 25 °C).

Una vez conocidos los valores de σ_{ij}^{NOE} interglicosídicos es posible, en principio, calcular las distancias interprotónicas promedio $\langle r^{-6} \rangle$ asumiendo un comportamiento canónico de sólido rígido isotrópico. Es decir, un único tiempo de correlación que describa las reorientaciones de todas las parejas de protones y éste podría calcularse a partir de la σ_{ij}^{NOE} de una distancia conocida. Sin embargo, los oligosacáridos pueden ser flexibles y presentar movimientos internos y segmentales que se superpongan al movimiento hidrodinámico global haciendo que la aproximación del modelo rígido isotrópico no sea adecuada. Una solución válida para considerar la contribución de los movimientos segmentales es tomar varias distancias fijas y evaluar las desconocidas usando la referencia más próxima. De esta manera se minimiza el efecto producido por la contribución de los movimientos locales en la función de densidad espectral, $J(\omega)$. El otro posible problema a considerar es que el comportamiento hidrodinámico de la molécula no se ajuste a un modelo isotrópico. En este caso,

se podrán definir dos o tres tiempos de correlación correspondientes a cada eje de giro, por lo que la magnitud de la constante de velocidad de relajación cruzada longitudinal dependerá de la orientación del vector interprotónico considerado respecto a los ejes de giro.

Para fragmentos polisacáridicos de heparina³³, y algunos derivados⁴⁹ se ha descrito, efectivamente, un comportamiento anisotrópico en disolución. Este también se observa en el pentasacárido específico de la antitrombina-III⁴⁸. Los oligosacáridos 1-4, aunque presentan patrones de sulfatación diferentes, conservan esencialmente la misma estructura tridimensional de la heparina, por lo que cabe esperar un comportamiento análogo, y que es conveniente estudiar, antes de abordar el cálculo de distancias. De hecho, es posible detectar dicha pérdida de isotropía analizando la variación en las constantes de velocidad de relajación cruzada longitudinal entre parejas de protones con distancias "rígidas" conocidas, pero que presentan orientaciones diferentes respecto a los ejes moleculares. En nuestro caso, concretamente los vectores interprotónicos de los anillos de glucosamina H1-H2 y H2-H4 permiten analizar este aspecto en distintos puntos de los oligosacáridos. Estas dos distancias interprotónicas son fijas, ya que los residuos de glucosamina son rígidos en estos oligosacáridos, son, además, conocidas (por modelización molecular) y son prácticamente perpendiculares (**figura 2.3.12**).

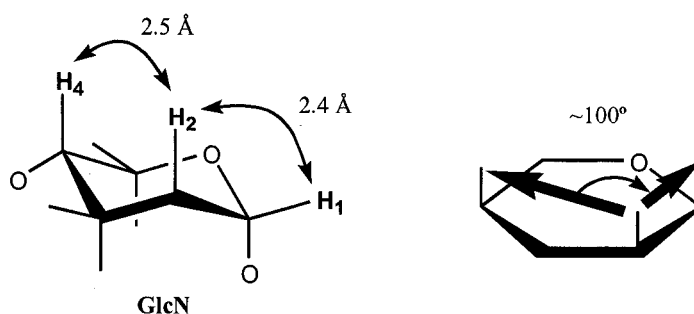


Figura 2.3.12 Distancias internucleares (Å) y orientaciones relativas (°) de los vectores $\overrightarrow{H1H2}$ y $\overrightarrow{H2H4}$ en un anillo de D-glucosamina.

Sus valores de σ^{NOE} a distintas intensidades de campo magnético se recogen en la **tabla 2.3.10** para los hexasacáridos 1-4.

Hexa	Frecuencia (MHz)	Vectores	Unidad		
			b	d	f
1	500	<u>H1-H2</u>	-0.20	-0.25	-0.15
		<u>H2-H4</u>	-0.11*	-0.11*	-0.04
	400	<u>H1-H2</u>	-0.18	-0.23	-0.13
		<u>H2-H4</u>	-0.08*	-0.08*	-0.03
2	800	<u>H1-H2</u>	-0.21	-0.22	-0.18
		<u>H2-H4</u>	-0.11	--	-0.07
	500	<u>H1-H2</u>	-0.16	-0.20	-0.13
		<u>H2-H4</u>	-0.05	--	-0.02
	400	<u>H1-H2</u>	-0.14	-0.19	-0.12
		<u>H2-H4</u>	-0.03	--	-0.01
3	500	<u>H1-H2</u>	-0.19	-0.21	-0.15
		<u>H2-H4</u>	-0.10*	-0.10*	--
	400	<u>H1-H2</u>	--	-0.18	-0.07
		<u>H2-H4</u>	-0.07*	-0.07*	--
4	500	<u>H1-H2</u>	-0.17*	-0.17*	-0.17*
		<u>H2-H4</u>	--	--	-0.07
	400	<u>H1-H2</u>	-0.14	-0.16	-0.16
		<u>H2-H4</u>	--	--	--

* promedio de varios residuos equivalentes

Tabla 2.3.10 Valores experimentales de σ^{NOE} (s^{-1}) para los residuos de *D*-glucosamina de 1, 2, 3, y 4, a distintas intensidades de campo magnético. (D_2O , 25 °C).

Lo más destacable es que las distancias interprotónicas para estas parejas de núcleos que se obtienen de los modelos – estructuras de mínima energía calculadas con el campo de fuerzas AMBER– son muy parecidas (2.5 y 2.4 Å) mientras que, por el contrario, sus valores de σ_{ij}^{NOE} son apreciablemente diferentes (**tabla 2.3.10**). En todos los casos se observa que $|\sigma_{H1H2}| \gg |\sigma_{H2H4}|$, siempre por encima del error experimental.

Como ejemplo, en la **figura 2.3.13** se ilustra la diferencia entre las pendientes de las curvas de crecimiento para el caso del residuo D-GlcN f de **1**. Esta discrepancia se debe a la diferente influencia que los movimientos moleculares tienen en la relajación cruzada de cada pareja. En este caso, además, se puede descartar una posible influencia de los movimientos internos ya que todos los protones implicados se encuentran sobre el mismo residuo, que es rígido, por lo que se verían afectados de igual forma por dicha contribución.

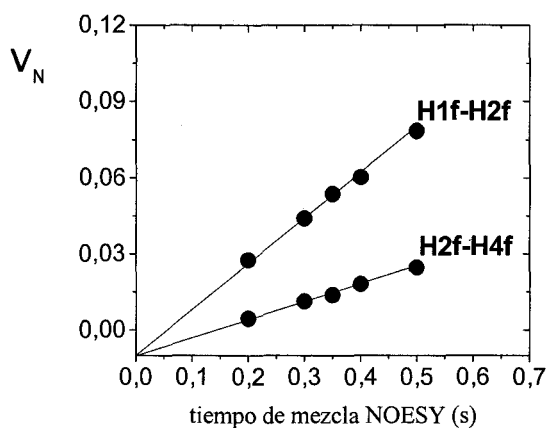


Figura 2.3.13 Curva de crecimiento de los NOEs H1-H2 y H2-H4 correspondientes al residuo de D-glucosamina f de **1**.

La causa de este comportamiento de las constantes de velocidad de relajación cruzada longitudinal debe estar, por tanto, en un comportamiento global anisotrópico, de acuerdo con los precedentes señalados anteriormente. En este caso las diferentes orientaciones de los vectores interprotónicos son las responsables de dicha diferencia en los valores de σ_{ij}^{NOE} . Esto está de acuerdo con el hecho de que los vectores H1-H2 y H2-H4 no sean paralelos entre sí. Además, según los modelos teóricos obtenidos mediante mecánica molecular (capítulo 3) el vector H1-H2 siempre es aproximadamente paralelo al eje principal de inercia de los oligosacáridos y H2-H4 aproximadamente perpendicular a éste.

Al disponer de datos de σ_{ij}^{NOE} para diferentes intensidades de campo magnético es posible extraer información más precisa de cómo varía la función de densidad espectral con la orientación e independientemente de la contribución de la distancia interprotónica. En este caso, a partir de los cocientes de σ_{ij}^{NOE} a 500 y 400 MHz se ha calculado un tiempo de correlación aparente - $\tau_{i,j}$ - para cada vector (tabla 2.3.11). Para este cálculo, se ha empleado la expresión de la función de densidad espectral correspondiente a una reorientación rígida isotrópica, aún cuando no tiene sentido físico en este caso hacer referencia a un tiempo de correlación global*. Los tiempos de correlación aparentes se obtienen resolviendo la ecuación:

$$\frac{\sigma_{500}^{NOE}}{\sigma_{400}^{NOE}} = \frac{5 + 20 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \tau_c^2 - 4 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^2 - 16 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^4}{5 + 20 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^2 - 4 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \tau_c^2 - 16 \cdot \omega_{400}^2 \cdot \omega_{500}^2 \cdot \tau_c^4}$$

Hexa	Vector	Unidad		
		b	d	f
1	<u>H1 - H2</u>	0.98	1.06	0.87
	<u>H2 - H4</u>	0.64	0.64	0.67
2	<u>H1 - H2</u>	0.89	1.37	1.12
	<u>H2 - H4</u>	0.56	--	0.53
3	<u>H1 - H2</u>	--	0.83	0.52
	<u>H2 - H4</u>	0.62	0.62	--
4	<u>H1 - H2</u>	0.77	1.27	1.27
	<u>H2 - H4</u>	--	--	--

Tabla 2.3.11 *Tiempos de correlación aparentes (τ_0 ; ns) para los vectores internos $\overrightarrow{H1H2}$ y $\overrightarrow{H2H4}$ de los residuos de D-glucosamina de 1, 2, 3, y 4. (D_2O , 25 °C).*

* Esta aproximación se ha empleado para cuantificar el efecto de la anisotropía. Por ello, nos referiremos a los tiempos de correlación obtenidos para cada par protónico como tiempos de correlación "aparentes" para distinguirlo de los tiempos de correlación globales propios de un modelo isotrópico.

Para este tipo de moléculas, con una geometría aproximadamente cilíndrica, puede sugerirse un modelo dinámico del tipo rotor trompo-simétrico (elipsoide), caracterizado por dos tiempos de correlación, correspondientes a las rotaciones en torno al eje principal de inercia ($\tau_{||}$) y en torno a cualquier eje perpendicular a éste (τ_{\perp}), verificándose siempre $\tau_{\perp} > \tau_{||}$ (figura 2.3.14). Según este modelo la relajación cruzada de los vectores paralelos al eje de inercia de la molécula, como $\overline{H1-H2}$, estaría dominada por τ_{\perp} , mientras que los vectores perpendiculares, como $\overline{H2-H4}$ estarían, además, influenciados por $\tau_{||}$. Los valores de tiempos de correlación aparentes obtenidos (tabla 2.3.11) son significativamente diferentes y concuerdan con este comportamiento. Por ejemplo, para la unidad **d** del compuesto **1** el vector $\overline{H1-H2}$, paralelo al eje de inercia experimenta el tiempo de correlación mas largo (1.06 ns) y el vector perpendicular, $\overline{H2-H4}$, el más corto (0.64 ns).

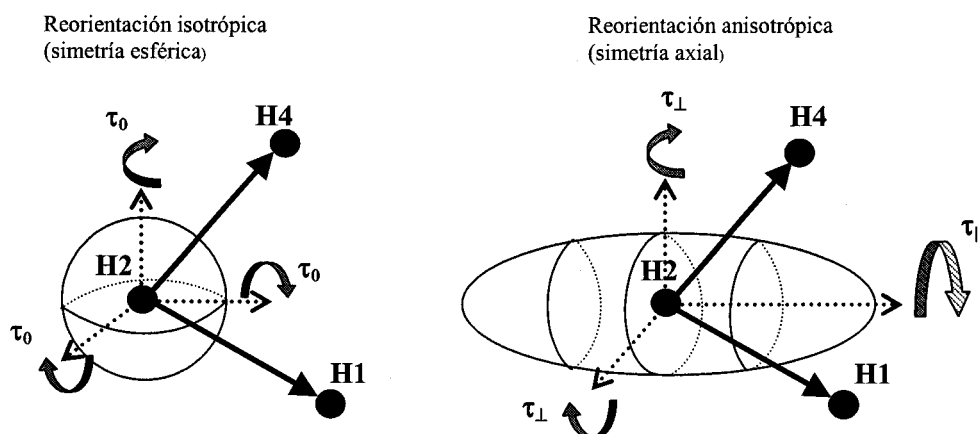


Figura 2.3.14 Modelo de reorientación de los vectores $\overline{H1H2}$ y $\overline{H2H4}$ en un rotor rígido isotrópico trompo-esférico (izqda.) y en un rígido anisotrópico trompo-simétrico (dcha.).

Por lo tanto, todos los datos anteriores (tablas 2.3.10 y 2.3.11; figuras 2.3.12 y 2.3.13) indican que la reorientación molecular en disolución de los oligosacáridos 1-4 es anisotrópica y caracterizada por una simetría axial (figura 2.3.14). Esta anisotropía impide obtener distancias interprotónicas directamente a partir de σ_{ij}^{NOE} , considerando un modelo rígido isotrópico.

El modelo de reorientación de rotor trompo-simétrico ha sido anteriormente aplicado con relativo éxito para la interpretación de los datos de NOE ^1H - ^1H y de relajación longitudinal de ^{13}C (T_1) en los casos de la heparina y la heparina N-desulfatada y N-acetilada, pero en dichos estudios los tiempos de correlación característicos τ_{\perp} y τ_{\parallel} se determinaron por un método de ensayo-error⁴³.

Hricovini y Torri⁴⁸ demostraron que este tipo de reorientación anisotrópica tiene lugar también en el caso del pentasacárido específico de la AT-III, y, tras un riguroso estudio de los datos de relajación homo- (NOEs) y heteronuclear (T_1 y T_2) pudieron caracterizar los movimientos globales e internos y calcular de forma precisa los tiempos de correlación característicos (τ_{\perp} y τ_{\parallel} 1.48 ns y 0.45 ns, respectivamente). Posteriormente, Mikhailov et al.⁴⁹, indicaron la conveniencia de considerar el modelo anisotrópico en el estudio de un hexasacárido modelo de la región regular (con una secuencia de residuos complementaria a la de 1), pero, sin embargo, hicieron uso de un tiempo de correlación promedio isotrópico de 1.6 ns para la obtención de distancias mediante la metodología de la aproximación de la matriz de relajación iterativa (IRMA), que incluyeron como restricciones en cálculos de minimización energética. Esta aproximación "isotrópica", para la que ellos estimaron un error de ~30% (aunque el error cometido en las distancias es mucho menor, debido al factor r^{-6}), les permitió definir la estructura molecular global como una hélice a derechas, aunque es posible que estos resultados puedan representar un colectivo "virtual" de estructuras que pueden diferir del mínimo global debido a las restricciones de distancia impuestas. Además, los resultados de las dinámicas moleculares sin restricciones que llevaron a cabo, produjeron resultados poco satisfactorios, ya que se observaron deformaciones en algunos de los anillos de glucosamina, incompatibles con los datos experimentales. Otro aspecto que no se tuvo en cuenta es el efecto de los movimientos internos, aunque Hricovini y Torri demostraron que tanto la anisotropía como el efecto de los movimientos internos deben ser considerados para este tipo de moléculas.

En nuestro caso y sobre la base de los resultados y los estudios mencionados sobre heparina y derivados, decidimos no abordar la obtención directa de distancias interprotónicas mediante aproximaciones "isotrópicas". La obtención de distancias a partir de los datos de σ_{ij}^{NOE} considerando la anisotropía, sin embargo, implica que la función de densidad espectral toma una forma demasiado compleja. El número de variables de las que depende en este caso la relación " $\sigma_{ij}^{NOE} \leftrightarrow r_{ij}$ " (τ_{\perp} y τ_{\parallel} , τ_{internos} y orientación relativa del vector) implica que el sistema está subdefinido para el conjunto de datos de los que se dispone. Una solución a este inconveniente sería obtener una descripción del modelo dinámico de reorientación de una forma independiente. Esto se puede alcanzar mediante un análisis completo de la dinámica de la reorientación molecular en disolución a través de los estudios de relajación heteronuclear de ^{13}C (T_1 , T_2 , y NOE), que se están llevando a cabo, y cuyos datos se recogen en un apartado posterior. La obtención, de esta forma, de los parámetros que definan el modelo, nos permitiría la determinación precisa de los valores de distancias para poder incluirlos en un proceso posterior de refinamiento estructural.

A pesar de todo, es posible establecer diferencias significativas entre los hexasacáridos 1-4 que se derivan de los valores de σ_{ij}^{NOE} , independientemente de los datos de distancias. En particular, lo más significativo resulta del análisis de los datos correspondientes a las uniones "*D-GlcN*→*L-IdoA*" (tabla 2.3.8). Para ilustrar este análisis se han representado en la figura 2.3.15, mediante barras, los valores absolutos de σ_{ij}^{NOE} (*H1'-H4*, y *H1'-H3*) a 500 MHz.

La comparación de $\sigma(H1'-H4)$ y $\sigma(H1'-H3)$ entre 4 y 1 indica que, considerando los errores experimentales, la presencia o no del grupo sulfato en la posición 6-GlcN no tiene ningún efecto apreciable sobre los enlaces glicosídicos *D-GlcN*→*L-IdoA*, en términos de sus valores de σ_{ij}^{NOE} . Sin embargo, cuando la comparación se realiza entre 3 y 1, se observa un considerable aumento de los valores de $\sigma(H1'-H3)$ para el hexasacárido 3, muy por encima del error experimental, mientras que no se produce variación significativa para los valores

de $\sigma(H1'-H4)$. Esto resulta en un cambio en la pauta de σ_{ij}^{NOE} interglucosídica entre estos dos hexasacáridos ($\sigma(H1'-H4) > \sigma(H1'-H3)$ para 1, que pasa a ser $\sigma(H1'-H3) > \sigma(H1'-H4)$ para 3). El resultado es el mismo si se comparan 3 y 4, lo que es de esperar puesto que hemos comprobado que la 6-O-sulfatación no produce ningún cambio en la σ_{ij}^{NOE} interglucosídica.

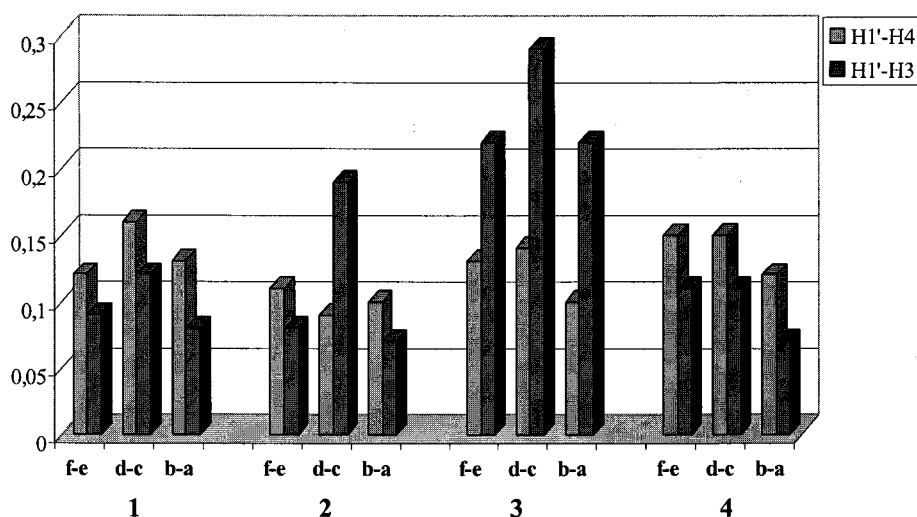


Figura 2.3.15 Gráfica de barras de los valores de $|\sigma_{ij}^{NOE}|$ a 500 MHz para las uniones D-GlcN→L-IdoA.

La comparación 3 vs. 1, o 3 vs. 4, pues, indica claramente que la sulfatación o no en la posición 2 del anillo de L-iduronato tiene un efecto considerable sobre los valores de $\sigma(H1'-H3)$ y $\sigma(H1'-H4)$ de la unión D-GlcN→L-IdoA que implique a dicho anillo. Concretamente, el efecto consiste en una disminución, en valor absoluto, de $\sigma(H1'-H3)$ con la 2-O-sulfatación. La comprobación de esto viene del análisis de los valores del hexasacárido 2 (figura 2.3.15). Efectivamente, la comparación de los residuos a y e (sulfatados en 2), con el residuo c (no sulfatado), resulta, de nuevo, en el cambio de pauta $\sigma(H1'-H4)/\sigma(H1'-H3)$ comentado anteriormente.

Estos efectos no pueden asociarse a cambios en las conformaciones anulares, ya que, según hemos visto, los datos de constantes de acoplamiento indican que la 2-O-sulfatación no tiene un efecto apreciable en las poblaciones de conformeros ${}^1\text{C}_4$ y ${}^2\text{S}_0$. Por otro lado, los cálculos de modelización molecular predicen, para todos los tipos de uniones *D-GlcN*→*L-IdoA* presentes en los 4 hexasacáridos, que la distancia H1'-H3 siempre es más corta que la H1'-H4, independientemente de la sustitución y de la conformación del anillo de idurónico. Esto, que se discute más ampliamente en el próximo capítulo, se cumple tanto en los mínimos energéticos que resultan de los mapas relajados, como en los valores promediados resultantes de las simulaciones de dinámica molecular. Es decir, los datos de σ_{ij}^{NOE} están de acuerdo con las distancias que predicen los cálculos teóricos en el caso de anillos de idurónico con la posición 2 libre, pero difieren en el caso de que dicha posición esté sulfatada, para los cuales la pauta de intensidades de NOEs cambia.

Evidentemente, una explicación se podría encontrar argumentando un nivel pobre de resolución de los cálculos, fallando por tanto su capacidad de reproducir algún tipo de cambio conformacional de dichos enlaces glicosídicos, dependiente de la sulfatación o no-sulfatación del anillo de idurónico, que sea responsable de dichos efectos. Un argumento de este tipo supondría en nuestro caso, un importante problema a la hora de modelizar estos sistemas moleculares, ya que las simulaciones de dinámica molecular que se han llevado a cabo se encuentran dentro de las de más alto nivel en mecánica molecular (tratamiento explícito del disolvente y tratamiento de sumas de Ewald para las interacciones electrostáticas), y que han sido capaces de reproducir efectos más sutiles, como los relativos a las "pseudorrotaciones" de los anillos de idurónico (capítulo 3).

Sin embargo, bajo la suposición de que las predicciones de las simulaciones de dinámica molecular son correctas, una explicación posible es que la anisotropía, unida a los movimientos internos, afectan a los NOEs interglicosídicos *D-GlcN*→*L-IdoA* de forma diferente según la sustitución en la posición 2 del anillo de idurónico. La hipótesis es que la sulfatación en dicha

posición si bien sabemos que no afecta a las poblaciones de confórmeros, sí puede afectar a la velocidad de interconversión entre ambos, lo que hace que los tiempos de correlación efectivos de los vectores H1'H4 y H1'H3 sean distintos según el anillo de iduronato esté o no sulfatado. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el vector H1'H3 es el que experimentalmente más se ve afectado, lo que está de acuerdo con que es éste vector el que sufre mayor cambio de orientación relativa cuando se produce una transición conformacional ${}^1C_4 \rightarrow {}^2S_0$, o viceversa, según los modelos teóricos.

Finalmente, otro aspecto que se deduce de los valores de σ_{ij}^{NOE} es la presencia de movimientos segmentales que hacen que la reorientación de la molécula sea más rápida a medida que nos acercamos a los extremos. Esto se ve reflejado en una disminución generalizada de σ_{ij}^{NOE} , de posiciones equivalentes, hacia los extremos moleculares (tablas 2.3.8 y 2.3.10), así como en la distribución de tiempos de correlación calculados, que también disminuye hacia los extremos (tabla 2.3.11).

2.3.2.5 Cotas de distancias interglicosídicas. Análisis semicuantitativo de σ_{ij}^{NOE} . Estudio comparativo de los hexasacáridos.

A pesar de que para la obtención de distancias interprotónicas basadas en NOEs es necesaria la consideración de los efectos de la anisotropía y los movimientos locales o segmentales sobre la relajación, con el objeto de poder realizar un estudio comparativo entre las estructuras de 1-4, se ha realizado un análisis semicuantitativo que considera los efectos de la anisotropía sin resolver analíticamente los dos tiempos de correlación. El modelo que se propone se basa en que los vectores H1-H2 y H2-H4 de glucosamina incluyen implícitamente el efecto de la anisotropía y que, debido su orientación respecto del eje principal de inercia molecular, se les podría considerar representativos de los efectos extremos de este tipo de reorientación. De esta manera las relaciones $\sigma_{ij}^{NOE} / r^{-6}$ para H1-H2 y H2-H4 pueden ser utilizadas como referencias "límites" (sus distancias son conocidas) para la estimación de un rango de distancias

internucleares a partir de σ_{ij}^{NOE} de vectores desconocidos. Para ello asumimos, que cualquiera que sea la orientación de un vector interprotónico no podrá experimentar un tiempo de correlación más largo que el vector más lento, que sería el paralelo al eje de inercia, esto es H1-H2. Por el contrario tampoco podría reorientarse más rápidamente que el vector de referencia perpendicular, H2-H4. De esta manera a partir del valor experimental de σ_{ij}^{NOE} para un vector interglicosídico, se acota la distancia interprotónica calculada frente a dos referencias: $\sigma^{NOE}(H2-H4)$ (cota inferior) y $\sigma^{NOE}(H1-H2)$ (cota superior). Los datos se recogen en la **tabla 2.3.12**.

Hexa	f-e		e-d		d-c		c-b		b-a	
	H1'-H4	H1'-H3	H1'-H4	H1'-H4	H1'-H3	H1'-H4	H1'-H4	H1'-H4	H1'-H3	
1	2.02*	2.11	2.39	2.27	2.35	2.35	2.32	2.55		
	2.49†	2.61	2.71	2.59	2.68	2.58	2.55	2.80		
2	1.82	1.92	2.29	2.37	2.10	2.26	2.22	2.42		
	2.44	2.57	2.61	2.69	2.38	2.64	2.60	2.83		
3	2.32	2.12	2.22	2.29	2.03	2.22	2.42	2.12		
	2.46	2.25	2.49	2.57	2.27	2.44	2.67	2.34		
4	2.13	2.24	2.09	2.13	2.24	2.09	2.21	2.42		
	2.45	2.58	2.40	2.45	2.58	2.40	2.54	2.78		
HEP (¹ C ₄)	2.48	2.24	2.32	2.48	2.24	2.32	2.48	2.24		
HEP (² S ₀)	2.30	3.08	2.60	2.30	3.08	2.60	2.30	3.08		

Tabla 2.3.12 Rango de distancias interprotónicas (Å) interglicosídicas obtenidas a partir de $\sigma^{NOE}(500\text{ MHz})$ para 1, 2, 3, y 4. Para toda la tabla: *Distancia obtenida tomando $\overrightarrow{H2H4}$ como referencia. †Distancia tomando $\overrightarrow{H1H2}$ como referencia

En todos los casos, de las posibles referencias, se emplearon las $\sigma^{NOE}(H1-H2)$ y $\sigma^{NOE}(H2-H4)$ de los vectores de glucosamina más próximos en el espacio al enlace glicosídico considerado. De esta manera se pretende reducir la diferente contribución de los movimientos segmentales a lo largo de la cadena (especialmente en el caso de las uniones idurónico-glucosamina). Esta

contribución se puede reflejar tanto directamente (como movimiento interno) como por la disminución de la estimación de la anisotropía en las zonas mas flexibles.

Los valores recogidos en dicha tabla se representan, para mayor claridad en la **figura 2.3.14**, junto con los datos de la heparina natural.

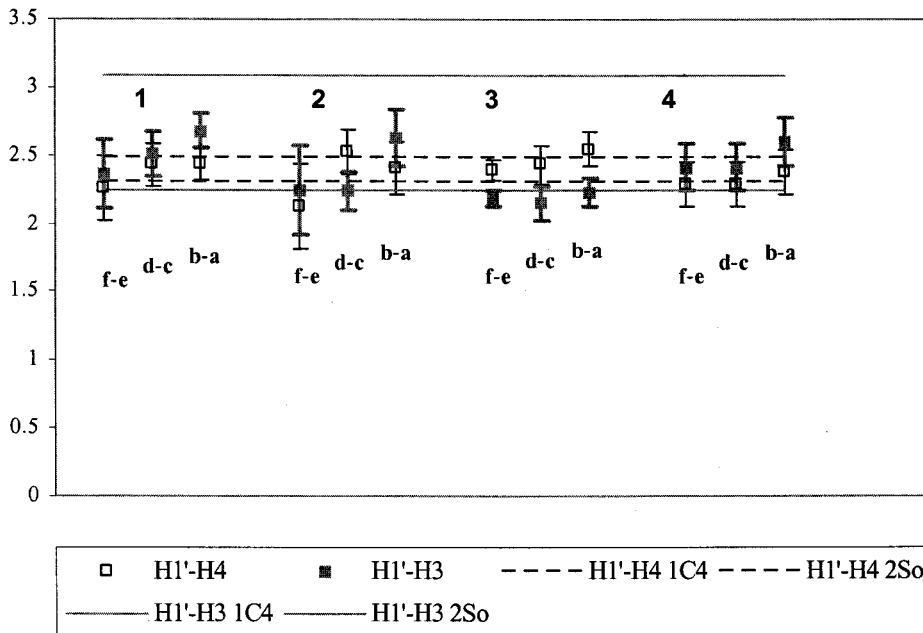


Figura 2.3.15 Representación gráfica de los intervalos de distancias interprotónicas (Å) para las uniones glicosídicas de 1, 2, 3, y 4.

2.3.3 ESTUDIO DE LA DINÁMICA MOLECULAR POR RELAJACIÓN DE ^{13}C .

2.3.3.1 Medida de los parámetros de relajación.

El solapamiento de las señales de los CH no anoméricos tanto en el caso de **1** como de **2**, en ^{13}C , hacia imposible la medida directa de T_1 y/o T_2 empleando secuencias de inversión recuperación monodimensionales. Por ello fue necesario recurrir a esquemas bidimensionales donde los periodos de inversión-recuperación⁵⁰ para T_1 o el eco de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)⁵¹ para T_2 se encuentran incluidos en un experimento del tipo HSQC.⁵² Las secuencias empleadas se basaron esencialmente las descritas por Bax,⁵³ Wagner⁵⁴ y por Kay⁵⁵. Se emplearon tres tipos de secuencias HSQC dependiendo del espectrómetro empleado. En el caso de una arquitectura Bruker Avance (500, 600 y 800 MHz) se usaron esquemas con aumento de la sensibilidad con detección eco-antieco invirtiendo la fase de los gradientes de selección de coherencia.⁵⁶ Cuando fue posible emplear gradientes en tres ejes, Bruker 800, se introdujeron gradientes de purga según x o y en los periodos de reenfoque de los módulos INEPT e INEPT reverso para eliminar los posibles efectos de imperfecciones en los pulsos de 180° . Para una de las medidas a 500 MHz se empleó un espectrómetro Bruker AMX cuyo software no era capaz de detección tipo eco-antieco. En este caso se empleó un módulo HSQC con selección de coherencia por ciclado de fases.⁵⁷

La medida de los tiempos de relajación “espín-red” (T_1) y “espín-espín” (T_2) se realizó con supresión de los efectos de la correlación cruzada entre los mecanismos de relajación dipolar y de relajación por anisotropía de desplazamiento químico (CSA).⁵³ Hricovini et al. demostraron con el pentasacárido modelo de heparina con la secuencia específica para la asociación a la antitrombina-III (AT-III)⁵⁸ que la correlación cruzada entre estos efectos debe ser tomada en cuenta para moléculas que presentan de ese tamaño intermedio, afectando en torno a un 10-15 % en la medida de T_1 y pudiendo

afectar hasta un 25 % en T_2 . Por ello, en todos los casos se desacopló en protón durante el periodo de relajación para suprimir la interferencia con la anisotropía del desplazamiento químico y posible relajación por correlación dipolar cruzada. Para la medida de variación de la magnetización transversal este desacoplamiento se efectuó empleando una secuencia CPMG modificada que introduce un pulso de 180° en protón cada cuatro spin ecos de ^{13}C .⁵³

Para la medida de la relajación dipolar cruzada se registró el NOE heteronuclear en el estacionario. Este fue evaluado como el incremento en la intensidad de los pico de cruce entre experimentos con y sin saturación previa de los protones. El experimento usado fue esencialmente igual a los descritos, siguiendo los mismos criterios para elegir la versión concreta que para R_1 y R_2 .^{53, 55} La secuencia consta básicamente de un periodo de relajación durante el que se irradia o no la frecuencia de ^1H , seguido creación de magnetización en ^{13}C . El resto del experimento: marcado de frecuencias e INEPT reverso con sin gradientes de campo y aumento de sensibilidad es igual que los empleados para medir R_1 y R_2 .

En todos los casos se ha hecho uso de la posibilidad de detectar exclusivamente los sistemas CH eliminando los CH_2 de los grupos hidroximetilo en las posiciones 6 de los residuos de glucosamina.

Finalmente, mediante estos esquemas fue posible medir individualmente el volumen de los picos de cruce para todos las parejas H-C de **2**. Desgraciadamente en el caso de **1**, con una peor dispersión se observó una degeneración de los picos correspondientes a las unidades centrales, salvo los anoméricos que si fue posible distinguir. Por lo tanto no ha sido posible distinguir los carbonos 2-5 de los iduronatos c y e ni los de las glucosaminas b y d.

Las constantes de relajación longitudinal y transversal se han estimado por ajuste no lineal del volumen de los picos frente al tiempo de relajación a un modelo exponencial de dos variables.

$$I(t) = I_0 e^{-Rt} \quad \text{modelo de dos parámetros}$$

$$I(t) = I_0 e^{-Rt} + I_\infty \quad \text{modelo de tres parámetros}$$

Este modelo, a pesar de su simplicidad es más robusto a posibles imperfecciones experimentales que el más complejo de tres parámetros que sólo es ventajoso en el caso de picos débiles con un fuerte *offset*.⁵⁹ Se obtuvo un ajuste aceptable para todos los picos de cruce aislados (figura 2.3.16) que fue mucho más preciso para 2 que para 1 (figura 2.3.6).

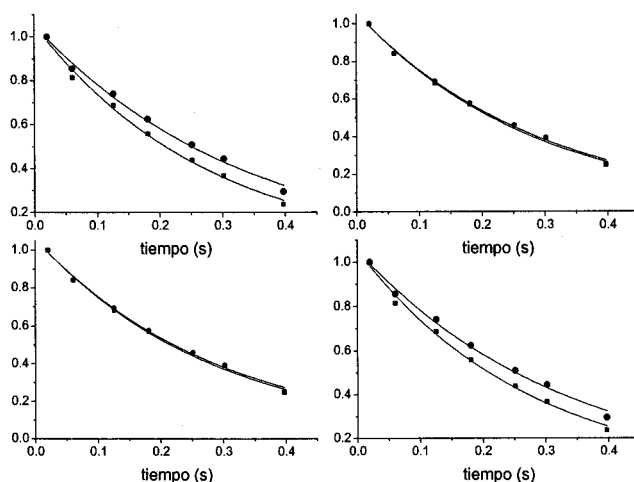


Figura 2.3.16 Curvas T_1 (a y b) y T_2 (c y d) para señales seleccionadas de 1 (a y c) y 2) (b y d) . Los puntos indican los valores experimentales y las curvas el ajuste a una función exponencial

Los valores obtenidos de T_1 y T_2 a T para 1 se muestran en la **tabla 2.3.14**. Para 2 a 11.7 y 18.72 T en la **tabla 2.3.15** y las magnitudes de NOE heteronuclear para ambos a estos mismos campos magnéticos en la **tabla 2.3.16**.

Unidad	Carbono	$^{13}\text{C } T_1$	$^{13}\text{C } T_1$	$^{13}\text{C } T_1$	$^{13}\text{C } T_2$	$^{13}\text{C } T_2$	$^{13}\text{C } T_2$
		[11.7 T]	[14.04 T]	[18.72 T]	[11.7 T]	[14.04 T]	[18.72 T]
a	C-1	0.46	0.31	0,41	0.17	0.29	0,20
	C-2	0.23	0.33	0,41	0.28	0.19	0,18
	C-3	0.33	0.28	0,41	0.15	0.12	0,26
	C-4	0.18	0.30	0,39	--	0.18	0,18
	C-5	0.26	0.31	0,46	0.22	0.14	0,17
b	C-1	0.22	0.25	0,36	0.16	0.11	0,17
	C-2	0.21 ^{4,6}	0.28 ^{4,6}	0,43 ^{4,6}	0.21 ^{4,6}	0.27 ^{4,6}	0,21 ^{4,6}
	C-3	0.21 ⁴	0.28 ⁴	0,38 ⁴	0.13 ⁴	--	0,23 ⁴
	C-4	0.21 ⁴	0.25 ⁴	0,34 ⁴	0.25 ⁴	0.16 ⁴	0,16 ⁴
	C-5	0.21 ⁴	0.27 ⁴	0,39 ⁴	0.14 ⁴	0.15 ⁴	0,16 ⁴
c	C-1	0.26	0.23	0,35	0.08	0.09	0,24
	C-2	0.27 ⁵	0.25 ⁵	0,39 ⁵	0.15 ⁵	0.18 ⁵	0,15 ⁵
	C-3	0.27 ⁵	0.27 ⁵	0,37 ⁵	0.15 ⁵	0.16 ⁵	0,17 ⁵
	C-4	0.26 ⁵	0.28 ⁵	0,36 ⁵	0.17 ⁵	0.17 ⁵	0,21 ⁵
	C-5	0.26 ⁵	0.29 ⁵	0,41 ⁵	0.18 ⁵	0.16 ⁵	0,15 ⁵
d	C-1	0.23	0.27	0,39	0.20 ⁶	0.12 ⁶	0,07
	C-2	0.21 ^{2,6}	0.28 ^{2,6}	0,43 ^{2,6}	0.21 ^{2,6}	0.27 ^{2,6}	0,21 ^{2,6}
	C-3	0.21 ²	0.28 ²	0,38 ²	0.13 ²	--	0,23 ²
	C-4	0.21 ²	0.25 ²	0,34 ²	0.25 ²	0.16 ²	0,16 ²
	C-5	0.21 ²	0.27 ²	0,40 ²	0.14 ²	0.15 ²	0,16 ²
e	C-1	0.26	0.24	0,42	0.08	0.16	0,22
	C-2	0.27 ³	0.25 ³	0,39 ³	0.15 ³	0.18 ³	0,15 ³
	C-3	0.27 ³	0.27 ³	0,37 ³	0.15 ³	0.16 ³	0,17 ³
	C-4	0.26 ³	0.28 ³	0,36 ³	0.17 ³	0.17 ³	0,21 ³
	C-5	0.26 ³	0.29 ³	0,41 ³	0.18 ³	0.16 ³	0,15 ³
f	C-1	0.30	0.29	0,40	0.20 ⁴	0.12 ⁴	0,23
	C-2	0.21 ^{2,4}	0.28 ^{2,4}	0,43 ^{2,4}	0.21 ^{2,4}	0.27 ^{2,4}	0,21 ^{2,4}
	C-3	0.23	0.31	0,40	0.21	0.18	0,23
	C-4	0.24	0.28	0,46	0.11	0.21	0,22
	C-5	0.35	0.32	0,41	0.17	0.16	0,21

Tabla 2.3.14 Tiempos de relajacion longitudinal y transversal de ^{13}C [T_1 y T_2 (s)], en D_2O , del hexasacárido 1 (25 °C), a distintos campos magnéticos.

Unidad	Carbono	$^{13}\text{C } T_1$	$^{13}\text{C } T_1$	$^{13}\text{C } T_2$	$^{13}\text{C } T_2$
		[11.7 T]	[18.72 T]	[11.7 T]	[18.72 T]
a	C-1	0.34	0.47	0.17	0.19
	C-2	0.28	0.42	0.21	0.24
	C-3	0.29	0.42	0.20	0.25
	C-4	0.29	0.41	0.22	0.27
	C-5	0.28	0.43	0.15	0.17
b	C-1	0.25	0.39	0.17	0.19
	C-2	0.26	0.40	0.21	0.25
	C-3	--	--	--	--
	C-4	0.26	0.37	0.19	0.24
	C-5	0.26	0.37	0.22	0.26
c	C-1	0.26	0.38	0.12	0.15
	C-2	--	--	--	--
	C-3	0.26	0.38	0.17	0.16
	C-4	0.25	0.36	0.20	0.19
	C-5	0.23	0.36	0.08	0.08
d	C-1	0.24	0.38	0.16	0.21
	C-2	0.24	0.37	0.18	0.24
	C-3	0.23	0.38	0.18	0.26
	C-4	0.24	0.36	0.19	0.20
	C-5	0.25	0.36	0.17	0.21
e	C-1	0.26	0.38	0.11	0.12
	C-2	0.26	0.38	0.17	0.18
	C-3	0.25	0.39	0.16	0.18
	C-4	0.26	0.37	0.21	0.23
	C-5	0.24	0.37	0.13	0.14
f	C-1	0.30	0.44	0.18	0.19
	C-2	0.28	0.42	0.19	0.23
	C-3	0.28	0.44	0.21	0.26
	C-4	0.29	0.44	0.21	0.26
	C-5	0.27	0.41	0.19	0.25

Tabla 2.3.15 Tiempos de relajación longitudinal y transversal de ^{13}C [T_1 y T_2 (s)], en D_2O , del hexasacárido 2 (25 °C), a distintos campos magnéticos.

Unidad	Carbono	1	1	1	2
		[11.7 T]	[14.04 T]	[18.72 T]	[18.72 T]
a	C-1	114	57	67	44.8
	C-2	43	54	42	43.8
	C-3	48	64	77	39.8
	C-4	98	55	49	40.4
	C-5	62	47	56	38.0
b	C-1	36	39	29	39.1
	C-2	66	46	52	39.0
	C-3	75	68	48	
	C-4	113	32	36	33.4
	C-5	48	57	58	34.7
c	C-1	102	112	46	36.5
	C-2	70	31	39	
	C-3	48	25	39	33.1
	C-4	72	56	54	39.7
	C-5	46	52	58	27.7
d	C-1	82	35	21	31.2
	C-2	66	46	52	27.3
	C-3	75	68	48	27.0
	C-4	113	32	36	27.7
	C-5	48	57	58	26.6
e	C-1	102	41	30	36.1
	C-2	70	31	39	36.4
	C-3	48	25	39	36.0
	C-4	72	56	54	48.0
	C-5	46	52	58	44.5
f	C-1	82	101	67	49.1
	C-2	66	46	52	37.0
	C-3	75	83	46	35.5
	C-4	152	42	51	32.1
	C-5	48	40	54	37.2

Tabla 2.3.16 NOEs (%) heteronucleares a en D_2O , de los hexasacáridos 1 y 2 (25 °C), a distintos campos magnéticos.

2.3.3.2 Análisis cualitativo de los parámetros de relajación.

En primer lugar, los datos de ^{13}C T_1 no muestran diferencias sistemáticas apreciables entre los residuos de D-glucosamina y de L-iduronato, tal y como cabría esperar si la velocidad de interconversión fuera del mismo orden o más rápida que la rotación molecular global. Por otro lado, en el otro extremo de la escala de tiempo, el intercambio es suficientemente rápido como para promediar los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C , por lo que debe ser más rápido que 10^4 Hz.⁶⁰ Velocidades de intercambio entre estos dos extremos son difíciles de ver por técnicas de RMN.

Por otro lado, el efecto de la anisotropía detectada en los datos de relajación homonuclear se aprecia claramente en los anillos de glucosamina que presentan valores similares para los carbonos 2-5, aquellos en los vectores CH son paralelos entre si. Al tener la misma orientación y tratarse de residuos rígidos los movimientos internos son similares, por lo que la orientación respecto al eje molecular les afecta de igual manera.

En la practica una forma de analizar cualitativamente los resultados de relajación es considerar el cociente T_1/T_2 , en aquellos puntos donde esté por debajo de la media hay una mayor movilidad. Otro método, más cuantitativo, consiste en el calculo de los tiempos de correlación efectivos a partir de este cociente de una manera similar a la que se aplica en la relajación homonuclear. Estos análisis se han realizado para 1 y 2 y se muestran en las **tablas 2.3.17 – 2.3.20** y en las **figuras 2.3.17 – 2.3.19**.

		1	1	1	2	2
		[11.7 T]	[14.04 T]	[18.72 T]	[11.7 T]	[18.72 T]
IdoA a	C1	2.71	1.07	2.05	2.00	2.47
	C2	0.82	1.74	2.28	1.33	1.75
	C3	2.20	2.33	5.42	1.45	1.68
	C4	-	1.67	2.17	1.32	1.52
	C5	1.18	2.21	2.71	1.87	2.53
GlcN b	C1	1.38	2.27	2.12	1.47	2.05
	C2	1.00	1.04	2.05	1.24	1.60
		1.62		1.65		
	C4	0.84	1.56	2.13	1.37	1.54
	C5	1.50	1.80	2.44	1.18	1.42
IdoA c	C1	3.25	2.56	1.46	2.17	2.53
		1.80	1.39	2.60		
	C3	1.80	1.69	2.18	1.53	2.38
	C4	1.53	1.65	1.71	1.25	1.89
	C5	1.44	1.81	2.73	2.88	4.50
GlcN d	C1	1.15	2.25		1.50	1.81
	C2	1.00	1.04	2.05	1.33	1.54
	C3	1.62		1.65	1.28	1.46
	C4	0.84	1.56	2.13	1.26	1.80
	C5	1.50	1.80	2.44	1.47	1.71
IdoA e	C1	3.25	1.50		2.36	3.17
	C2	1.80	1.39	2.60	1.53	2.11
	C3	1.80	1.69	2.18	1.56	2.17
	C4	1.53	1.65	1.71	1.24	1.61
	C5	1.44	1.81	2.73	1.85	2.64
GlcN f	C1	1.50	2.42	1.74	1.67	2.32
	C2	1.00	1.04	2.05	1.47	1.83
	C3	1.10	1.72	0.43	1.33	1.69
	C4	2.18	1.33	2.09	1.38	1.69
	C5	2.06	2.00	1.95	1.42	1.64

Tabla 2.3.17 Cocientes T_1/T_2 para 1 y 2 a varios campos magnéticos.

			1		2
		[11.7 T]	[14.04 T]	[18.72 T]	[18.72 T]
IdoA a	C1	114	57	67	44.8
	C2	43	54	42	43.8
	C3	48	64	77	39.8
	C4	98	55	49	40.4
	C5	62	47	56	38
		73 (±31)	55 (±6)	58 (±14)	41 (±3)
GlcN b	C1	36	39	29	39.1
	C2	66	46	52	39
	C3	75	68	48	
	C4	113	32	36	33.4
	C5	48	57	58	34.7
		68 (±30)	48 (±14)	45 (±12)	37 (±3)
IdoA c	C1	102	112	46	36.5
	C2	70	31	39	
	C3	48	25	39	33.1
	C4	72	56	54	39.7
	C5	46	52	58	27.7
		68 (±23)	55 (±34)	47 (±9)	34 (±5)
GlcN d	C1	82	35	21	31.2
	C2	66	46	52	27.3
	C3	75	68	48	27
	C4	113	32	36	27.7
	C5	48	57	58	26.6
		77 (±24)	48 (±15)	43 (±15)	28 (±2)
IdoA e	C1	102	41	30	36.1
	C2	70	31	39	36.4
	C3	48	25	39	36
	C4	72	56	54	48
	C5	46	52	58	44.5
		68 (±23)	41 (±13)	44 (±12)	40 (±6)
GlcN f	C1	82	101	67	49.1
	C2	66	46	52	37
	C3	75	83	46	35.5
	C4	152	42	51	32.1
	C5	48	40	54	37.2
		85 (±40)	62 (±28)	54 (±8)	38 (±6)
Promedio		73 (±46)	52 (±20)	49 (±3)	36 (±2)
Máximo		152	112	77	49.1
Mínimo		36	25	21	26.6

Tabla 2.3.17 NOEs para 1 y 2 a varios campos magnéticos.

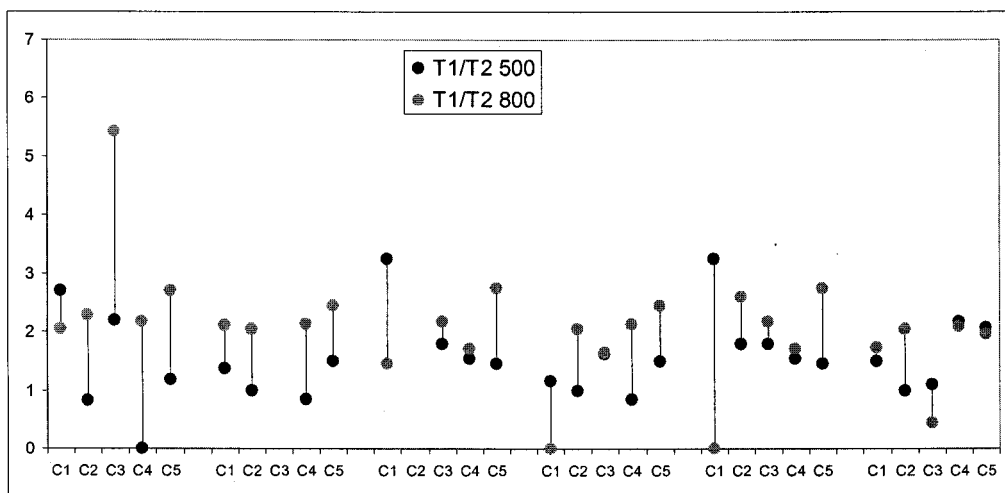


Figura 2.3.17 Cocientes $R2/R1$ para 1 en función del residuo .

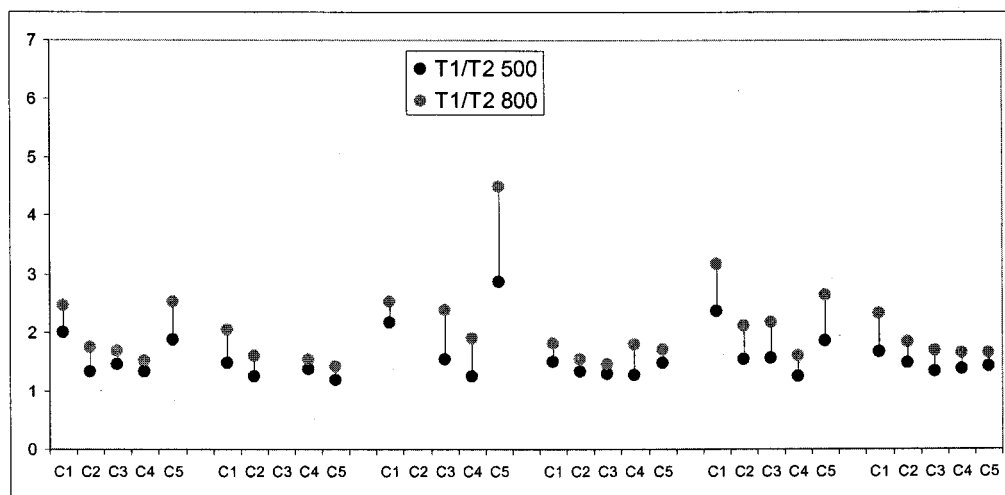


Figura 2.3.18 Cocientes $R2/R1$ para 2 en función del residuo .

		500		600		800	
		τ_{eff}	$\Delta\tau_{\text{eff}}$	τ_{eff}	$\Delta\tau_{\text{eff}}$	τ_{eff}	$\Delta\tau_{\text{eff}}$
IdoA a	C1	2.08	0.002	0.19	0.011	1.00	0.002
	C2			1.10	0.004	1.11	0.002
	C3	1.72	0.004	1.52	0.003	0.71	0.003
	C4			1.03	0.005	1.06	0.002
	C5	0.52	0.012	1.45	0.003	1.30	0.002
GlcN b	C1	0.87	0.008	1.48	0.003	1.04	0.003
	C2			0.12	0.010	1.00	0.002
	C3	1.19	0.006			0.77	0.003
	C4			0.94	0.005	1.04	0.002
	C5	1.05	0.007	1.15	0.004	1.19	0.002
IdoA c	C1	2.41	0.001	1.65	0.003	0.62	0.004
	C2	1.38	0.005	0.75	0.006	1.26	0.002
	C3	1.38	0.005	1.05	0.004	1.07	0.002
	C4	1.08	0.006	1.02	0.005	0.81	0.003
	C5	0.97	0.007	1.16	0.004	1.31	0.002
GlcN d	C1	0.44	0.013	1.47	0.003	2.17	
	C2			0.12	0.011	1.00	0.002
	C3	1.19	0.006			0.77	0.003
	C4			0.94	0.005	1.04	0.002
	C5	1.05	0.006	1.15	0.004	1.21	0.002
IdoA e	C1	2.41	0.003	0.87	0.005	0.92	0.003
	C2	1.38	0.005	0.75	0.006	1.26	0.002
	C3	1.38	0.005	1.05	0.004	1.07	0.002
	C4	1.08	0.006	1.02	0.005	0.81	0.003
	C5	0.97	0.007	1.16	0.004	1.31	0.002
GlcN f	C1	1.05	0.006	1.57	0.003	0.82	0.003
	C2			0.12	0.010	1.00	0.003
	C3	0.30	0.013	1.08	0.005	0.82	0.003
	C4	1.71	0.004	0.67	0.007	1.02	0.003
	C5	1.61	0.004			0.95	0.003

Tabla 2.3.19 *Tiempos de correlación efectivos calculados para 1 a partir del cociente de tiempos de relajación empleando Modelfree.*

		500		800	
		τ_{eff}	$\Delta\tau_{\text{eff}}$	τ_{eff}	$\Delta\tau_{\text{eff}}$
IdoA a	C1	1.56	0.008	1.20	0.004
	C2	0.81	0.016	0.83	0.006
	C3	0.98	0.013	0.78	0.007
	C4	0.78	0.017	0.67	0.008
	C5	1.44	0.009	1.23	0.004
GlcN b	C1	1.01	0.013	1.00	0.005
	C2	0.64	0.020	0.73	0.007
	C4	0.86	0.016	0.69	0.007
	C5	0.52	0.022	0.59	0.008
	C3	0.98	0.013	0.78	0.007
IdoA c	C1	1.70	0.008	1.23	0.004
	C3	1.08	0.012	1.16	0.005
	C4	0.66	0.021	0.92	0.006
	C5	2.19	0.006	1.89	0.003
	C2	0.81	0.017	0.83	0.006
GlcN d	C1	1.05	0.013	0.87	0.006
	C2	0.81	0.017	0.69	0.008
	C3	0.71	0.019	0.62	0.009
	C4	0.69	0.018	0.86	0.006
	C5	1.01	0.013	0.81	0.006
IdoA e	C1	1.85	0.008	1.47	0.003
	C2	1.08	0.013	1.03	0.005
	C3	1.12	0.012	1.06	0.005
	C4	0.64	0.019	0.74	0.007
	C5	1.42	0.009	1.27	0.004
GlcN f	C1	1.24	0.010	1.13	0.005
	C2	1.01	0.014	0.88	0.006
	C3	0.81	0.015	0.79	0.006
	C4	0.88	0.014	0.77	0.007
	C5	0.94	0.014	0.76	0.007

Tabla 2.3.20 *Tiempos de correlación efectivos calculados para 2 a partir del cociente de tiempos de relajación empleando Modelfree.*

2.3.3.2 Análisis numérico de la relajación de ^{13}C para 1.

Se ha realizado un análisis cuantitativo de los datos de relajación de 1.⁶¹ De acuerdo con los análisis previos de relajación homonuclear y heteronuclear, es evidente la necesidad de emplear un modelo anisotrópico para la cuantificación de las funciones densidad espectral. Este comportamiento está totalmente en concordancia con estudios de el pentasacárido de la antitrombina y de fragmentos poliméricos de heparina y derivados. De acuerdo con estos indicios y antecedentes se decidió emplear un modelo tipo Lipari-Szabo axialmente simétrico con dos constantes de difusión.

Para poder realizar el análisis numérico con garantías de un modelo con un número tan grande de parámetros ajustables es necesario disponer de el mayor número posible de restricciones experimentales y de la mayor calidad posible. Por ello se midieron T1, T2 y el NOE heteronuclear a tres campos diferentes, 800, 600, y 500 MHz. Debido al solapamiento de algunos picos de cruce entre posiciones análogas de 1 mismo residuo a lo largo de la cadena oligosacáridica. Se decidió considerar solamente los residuos terminales para este análisis. Los valores que de los parámetros del movimiento se obtuvieron minimizando la función residual y se muestran en la tabla 2.3.21.

	1	
$\tau_{ }$	640 ps	450 ps
τ_{\perp}	2.55 ns	1.48 ns
τ_{eff}	110 ps	50 ps
S^2	0.93	0.91

Tabla 2.3.21 *Parámetros de la función densidad espectral para 1 y anti.*

Estos resultados son comparables a los obtenidos por Hricovini para el pentasacárido de la antitrombina (tabla 2.3xx).⁵⁸ En el caso de 1 la mayor longitud, un residuo mas, haría esperar un tiempo de correlación perpendicular mas largo y uno paralelo análogo, como se observa. Aunque el aumento en el τ_{\perp} respecto a antitrombina pudiera parecer excesivo, la diferencia entre los factores de anisotropía, 3.3 y 4.0, es razonable. Aunque este aspecto debe ser

estudiado mas a fondo, parece lógico pensar que se trata de una desviación sistemática a tiempos mas largos probablemente debida a diferencias experimentales.

Este comportamiento anisotrópico es frecuente en heparina y polímeros análogos. Por, ejemplo el factor de anisotropía para la heparina y para su derivado epoxidado es de 50,⁶² mientras que para el polisacárido bacteriano K5 (de menos peso molecular) es de 20.⁶³ En el caso del epoxido de heparina, cuyos datos se han registrado a la misma temperatura que para **1**, el tiempo de correlación paralelo es de 800 ps indicando un volumen perpendicular al eje molecular similar en ambos casos.

Sin embargo este comportamiento no es tan acusado en oligosacáridos de tamaño similar a **1**. En el caso del pentasacárido LNF-1 el factor de anisotropía es 1.5 y los tiempos de correlación descritos están entre 500 y 800 ps.⁶⁴ Mas evidente es el ejemplo de un pentamanano cuya estructura es lineal pero debido a su flexibilidad el ajuste de sus datos a un modelo anisotrópico no supone mejora respecto al isotrópico.⁶⁵ Por lo tanto el alto factor de anisotropía de **1** y que se manifiesta en los datos homonucleares también para **2-4**, es indicación de una alta rigidez global de estos compuestos. Esta observación contrasta con la alta flexibilidad de los anillos de iduronato.

2.4 PARTE EXPERIMENTAL

La concentración de las muestras de 1, 2, 3, y 4, para RMN, estuvo siempre en el entorno de 10 mg/mL (~5mg de muestra disueltos en 500 μ L de disolvente). Las muestras se liofilizaron al menos 3 veces con D₂O, y posteriormente se disolvieron en D₂O del 99.97 %D (euriso-top®). El valor de pH* se ajustó en todos los casos en las proximidades de 7.0. Todos los espectros de RMN se registraron en D₂O a 25° C, salvo en casos concretos en los que se especifique otra temperatura, en espectrómetros Bruker AVANCE DRX-500 (sonda de detección inversa de 5mm doble ¹H/Banda-ancha, con gradientes en Z), y Bruker AVANCE DRX-400 (sonda directa 5mm QNP). Determinados experimentos (NOESYs de 2, y relajación de ¹³C de 1 y 2) se han llevado a cabo en los espectrómetros Bruker Digital Avance 800 MHz, y 600 MHz, del Parque Científico de Barcelona.

Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) respecto a la frecuencia de resonancia del TMS como referencia primaria. La calibración de los desplazamientos químicos se realizó a partir de la frecuencia base absoluta del núcleo correspondiente, y la relación de frecuencias, Ξ .

Los experimentos 2D DQF-COSY, TOCSY, y NOESY se realizaron en el modo sensible a la fase con el método TPPI (Time Proportional Phase Increment) para la detección en cuadratura en F1. Los experimentos HMQC se llevaron a cabo en modo magnitud, y los experimentos HSQC en el modo sensible a la fase con detección "eco-anti-eco". Para los espectros COSY, HMQC, y HSQC, se utilizaron programas de pulsos con gradientes en Z.

En los experimentos DQF-COSY se utilizaron típicamente matrices de datos de 4 K x 1 K, para anchuras espectrales de 5000 Hz, y 16-32 acumulaciones por incremento, dependiendo de la muestra. Se aplicaron funciones sen^2x desplazadas, en ambas dimensiones, y se aplicó *zero-filling* en F1 para aumentar la resolución digital expandiendo los datos a una matriz de 8 K x 2 K. Esta importante expansión de los datos confiere mayor precisión en la

obtención de las constantes ${}^3J_{H,H}$ por deconvolución recursiva en el dominio de frecuencias de los picos de cruce. Para tal efecto se hizo uso del programa DECO⁴⁴ implementado en el programa de procesamiento de RMN XWINNMR. Las constantes de acoplamiento teóricas se obtuvieron por aplicación de las ecuaciones tipo Karplus modificadas por Haasnoot et al.⁴⁵:

- Para **IdoA·2SO₃** (compuestos 1, 2, y 4) :

$${}^3J_{12} = 13.24 \cdot \cos^2(\alpha) - 0.91 \cdot \cos(\alpha) + 1.98697 - 5.89968 \cdot \cos^2(\alpha + 18.972) - 2.94984 \cdot \cos^2(18.972 - \alpha) - 0.18557 \cdot \cos^2(1.1935 - \alpha)$$

$${}^3J_{23} = 13.24 \cdot \cos^2(\alpha) - 0.91 \cdot \cos(\alpha) + 1.32871 + 0.22654 \cdot \cos^2(\alpha + 1.457) - 2.94984 \cdot \cos^2(18.972 - \alpha) - 0.18557 \cdot \cos^2(\alpha + 1.1935) - 3.133 \cdot \cos^2(20.15 - \alpha)$$

- Para **IdoA** (compuestos 2 y 3):

$${}^3J_{12} = 13.24 \cdot \cos^2(\alpha) - 0.91 \cdot \cos(\alpha) + 2.02725 - 2.94984 \cdot \cos^2(\alpha + 18.972) - 2.94984 \cdot \cos^2(18.972 - \alpha) - 3.133 \cdot \cos^2(\alpha + 20.15) - 0.18557 \cdot \cos^2(1.1935 - \alpha)$$

$${}^3J_{23} = 13.24 \cdot \cos^2(\alpha) - 0.91 \cdot \cos(\alpha) + 1.36899 + 0.22654 \cdot \cos^2(\alpha + 1.457) - 6.266 \cdot \cos^2(20.15 - \alpha) - 0.18557 \cdot \cos^2(\alpha + 1.1935)$$

- Para ambos, **IdoA·2SO₃** y **IdoA** (1, 2, 3, y 4):

$${}^3J_{34} = 13.24 \cdot \cos^2(\alpha) - 0.91 \cdot \cos(\alpha) + 1.41934 - 3.133 \cdot \cos^2(\alpha + 20.15) - 0.37114 \cdot \cos^2(1.1935 - \alpha) - 2.94984 \cdot \cos^2(\alpha + 18.972)$$

$${}^3J_{45} = 13.24 \cdot \cos^2(\alpha) - 0.91 \cdot \cos(\alpha) + 1.28843 - 0.18557 \cdot \cos^2(\alpha + 1.1935) + 0.22654 \cdot \cos^2(\alpha + 1.457) - 5.89968 \cdot \cos^2(18.972 - \alpha)$$

Para los experimentos TOCSY, típicamente se utilizaron matrices de datos de 4 K x 400, y 32-64 acumulaciones por incremento, dependiendo de la muestra. Se utilizó la secuencia MLEV-17 con 60 ms de período de mezcla isotrópica. Para mejorar la resolución se aplicaron funciones $\sin^2 x$ desplazadas, y predicción lineal en la dimensión F1.

Los experimentos de correlación ${}^1\text{H}$ - ${}^{13}\text{C}$ a un enlace se llevaron a cabo mediante secuencias HMQC o HSQC. En todos los casos se adquirió una matriz

de datos de 1 K x 256 para resolver anchuras espectrales de 5000 Hz y 12600 Hz en F2 y F1, respectivamente, realizando 16 acumulaciones por incremento. Se aplicaron funciones sen^2x con valores de desplazamiento (SSB) de 2.2 (F2) y 3.5 (F1), y se completó con ceros hasta una matriz final de 1K x 1K.

Los experimentos 2D-NOESY a diferentes tiempos de mezcla se llevaron a cabo a 500 y 400 MHz, así como a 800 MHz para **2**. Los tiempos de mezcla estuvieron entre 200 y 600 ms (típicamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, y 600 ms). Se utilizaron matrices de datos de 4K x 300, a 500 MHz, y 2K x 300, a 400 MHz, con 56 acumulaciones por incremento. Para tiempos de mezcla cortos (200, 250 ms) se utilizaron en algunos casos 64-80 acumulaciones, dependiendo de la muestra. Los volúmenes de los picos de cruce y diagonales se integraron haciendo uso del software standard de Bruker. Sólo se integraron aquellos picos suficientemente aislados, o aquellos completamente solapados que correlacionaban núcleos equivalentes en distintos residuos. Sólo en casos favorables se pudieron medir los volúmenes de los 2 picos a ambos lados de la diagonal, y los 2 picos diagonales, considerándose los promedios para la construcción de la curva de crecimiento del NOE. Para los casos desfavorables, si los tiempos de mezcla son suficientemente cortos, no disponer de todos los picos no afecta al comportamiento del crecimiento del NOE⁶⁶. Para verificar la linealidad del crecimiento en el rango de tiempo de mezcla considerado, se representaron las curvas del volumen normalizado (V_{ij}/V_{diag}) frente al tiempo de mezcla. Una vez comprobado, se obtuvieron las constantes de velocidad de relajación cruzada longitudinal, σ^{NOE} , por extrapolación a tiempo de mezcla cero de la relación lineal ($V_{ij}/[V_{\text{diag}} \cdot t_m]$) vs. t_m , donde V_{ij} , V_{diag} , y t_m , son los volúmenes de los picos de cruce y diagonal, y el tiempo de mezcla, respectivamente^{66,67}.

BIBLIOGRAFÍA:

- ¹ Duus J., Gotfredsen C.H., Bock K., *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4589-4614.
- ² Bush C.A., Martín-Pastor M., Imberty A., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1999**, 28, 269-293.
- ³ Roumestand C., Delay C., Gavín J.A., Canet D., *Magn. Reson. Chem.*, **1999**, 37, 451-478.
- ⁴ Poveda A, Jiménez-Barbero J., *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 27, 133-143.
- ⁵ Schneider H.-J., Hackett F., Rüdiger V., Ikeda H., *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1755-1785.
- ⁶ Widmalm G., *Carbohydrate Chemistry*, Blackie Academic & Professional; London, **1998**, Capítulo 11, pags. 448-502.
- ⁷ Homans S.W., *¹H NMR studies of oligosaccharides*, en *NMR of Macromolecules*, Oxford University Press; New York, **1993**, Capítulo 9, pags. 289-311.
- ⁸ Vliegthart J.F.G., Dorland L., van Halbeek H., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1983**, 41, 209-374.
- ⁹ van Kuik J.A., Vliegthart J.F.G, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **1991**, 3, 229-230.
- ¹⁰ van Kuik J.A., Hård K., Vliegthart J.F.G, *Carbohydr. Res.*, **1992**, 235, 53-68.
- ¹¹ Boubet S., Bock K, Smith D., Darvill A., Albersheim P., *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, 14, 475-477.
- ¹² Aue W.P., Bartholdi E., Ernst R.R., *J. Chem. Phys.*, **1976**, 64, 2229-2246.
- ¹³ Rance M., Sørensen O.W., Bodenhausen G., Wagner G., Ernst R.R., Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 117, 479-485.
- ¹⁴ Piantini U., Sørensen O.W., Ernst R.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6800-6801.
- ¹⁵ Davis A.L., Laue E.D., Keeler J., Moskau D., Lohman J., *J. Magn. Reson.*, **1991**, 94, 637-644.
- ¹⁶ Braunschweiler L., Ernst R.R., *J. Magn. Reson.*, **1983**, 53, 521-528.
- ¹⁷ Bax A., Davis D.G., *J. Magn. Reson.*, **1985**, 65, 355-360.
- ¹⁸ Bax A., *Methods Enzymol.*, **1989**, 176, 151-168.
- ¹⁹ Lemieux R.U., Kullnig R.K., Bernstein H.J., Schneider W.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 6098-6105..
- ²⁰ Karplus M., *J. Chem. Phys.*, **1959**, 30, 11-13.
- ²¹ Abraham R.J., Gatti G., *J. Chem. Soc.*, **1969**, Series B, 961-968.

- ²² Haasnot C. A. G., Leeuw F.A.A.M., Altona C., *Tetrahedron*, **1980**, 36, 2783-2792.
- ²³ Rao V.S.R., Balaji P.V., Qasba P.K., *Glycobiology*, **1995**, 5, 273-276.
- ²⁴ Neuhaus D., Williamson M., *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, **1989**, VCH, New York.
- ²⁵ Linhardt R.J., Toida T., *Carbohydrates in Drug Design*, Marcel Dekker, New York, **1997**, 277-341.
- ²⁶ Jacques L.B., *Science*, **1979**, 206, 528-533.
- ²⁷ Rabenstein D.L., Bratt P., Shierling D., Robert J.M., Guo W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3278-3285.
- ²⁸ Manning G.S., *Acc. Chem. Res.*, **1979**, 12, 443-449.
- ²⁹ Manning G.S., *Q. Rev. Biophys.*, **1978**, 11, 179-246.
- ³⁰ Mattai J., Kwak J. C. T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, 137, 175-190.
- ³¹ Rabenstein D. L., Robert J. M., Peng J., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 278, 239-256.
- ³² Casu B., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1985**, 43, 51-134.
- ³³ Mulloy B., Forster M. J., Jones C., Drake A. F., Johnson E. A., Davies D. B., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 255, 1-26.
- ³⁴ Yates E.A., Santini F., Guerrini M., Naggi A., Torri G., Casu B., *Carbohydr. Res.*, **1996**, 294, 15-27
- ³⁵ José Luis de Paz Carrera, *Tesis Doctoral*, Universidad de Sevilla, **2000**.
- ³⁶ Davis A.L., Laue E.D., Keeler J., Moskau D., Lohman J., *J. Magn. Reson.*, **1991**, 93, 54-62.
- ³⁷ Bax A., Davies D., *J. Magn. Reson.*, **1985**, 65, 355-366.
- ³⁸ Jeener J., Meier B.H., Bachmann P., Ernst R. R., *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71, 4546-4553.
- ³⁹ Willker W., Leibfritz D., Kerssebaum R., Bermel W., *J. Magn. Reson.*, **1993**, 31, 287-292.
- ⁴⁰ Zsiska M., Meyer B., *Carbohydr. Res.*, **1993**, 243, 225-258.
- ⁴¹ CS CHEMDRAW PRO 4.5, **1997**, CambridgeSoft Corp., Cambridge, USA.
- ⁴² van Boeckel C.A.A., van Aelst S.F., Wagenaars G.N., Mellema J.-R., Paulsen H., Peters T., Pollex A., Sinnwell V., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **1987**, 106, 19-29.
- ⁴³ Mulloy B., Forster M.J., Jones C., Davies D.B., *Biochem. J.*, **1993**, 293, 849-858.
- ⁴⁴ Jeannerat D., Bodenhausen G., *J. Magn. Reson.*, **1999**, 141, 133-140.
- ⁴⁵ Haasnoot C. A. G., Leeuw F.A.A.M., Altona C., *Tetrahedron*, **1980**, 36, 2783-2792.

- ⁴⁶ Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Casu B., Torri G., Bossennec V., Perly B., Sinaÿ P., Petitou M., Choay J., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 195, 157-167.
- ⁴⁷ Mulloy B., Forster M.J., *Glycobiology*, **2000**, 10, 1147-1156.
- ⁴⁸ Hricovíni M., Torri G., *Carbohydr. Res.*, **1995**, 268, 159-175.
- ⁴⁹ Mikhailov D., Linhardt R.J., Mayo K.H., *Biochem. J.*, **1997**, 328, 51-61.
- ⁵⁰ R. L. Vold, J. S. Waugh, M. P. Klein, D.E. Phelps, *J. Chem. Phys.* **1968**, 48, 3831-3832
- ⁵¹ S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, 29, 688-691
- ⁵² G. Gemmecker, H. Kessler, en 'Carbon-13C NMR Spectroscopy' cap 2 : *Methodology and Applications of Heteronuclear and Multidimensional ¹³C NMR to the Elucidation of Molecular Structure and Dynamics in the Liquid State* American Press 1995.
- ⁵³ L. E. Kay, L. Nicholson, F. Delaglio, A. Bax, D. A. Torchia. *J. Magn. Reson.* **1992**, 97, 359-375.
- ⁵⁴ K. T. Dayie, G. Wagner, *J. Magn Reson A*, **1994**, 111, 121-126
- ⁵⁵ N. A. Farrow, R. Muhandiram, A. U. Singer, S. M. Pascal, C. M. Kay, G. Gish, S. E. Shoelson, T. Pawson, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay, *Biochemistry*, **1994**, 33, 5984-6003
- ⁵⁶ A. G. Palmer III, J. Cabaña, P. E. Wright, M. Rance, *J. Magn. Reson. A*, **1994**, 111, 70-76.
- ⁵⁷ G. Bodenhausen, D. J. Rubem, *Chem. Phys Lett.*, **1980**, 69, 185-188
- ⁵⁸ M. Hricovíni, G. Torri, *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 159-175
- ⁵⁹ J. H. Viles, B. M. Duggan, E. Zaborowski, S. Schwazinger, J. j. A. Huntley, G. J. A. Kroon, H. J. Dyson, P. E. Wright, *J. Biomol. NMR*, **2001**, 21, 1-9
- ⁶⁰ B. Mulloy *Carbohydr. Res.* **1994**,
- ⁶¹ A. G. Palmer III, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001** , 30: 129-155
- ⁶² M. Hricovíni, M. Guerrini, G. Torri, S. Piani, F. Ungarelli, *Carbohydr. Res.* **1995**, 277, 11-23.
- ⁶³ M. Hricovíni, M. Guerrini, G. Torri, B. Casu, *Carbohydr. Res.* **1997**, 300, 69-76.
- ⁶⁴ T. Rundlöf, R. M. Venable, R. W. Pastor, J. Kowalewski, G. Widmalm, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 11847-11854.
- ⁶⁵ A. Almond, J. Bunkenborg, T. Franch, C. H. Gotfredsen, J. Ø. Duus. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 4792-4802.
- ⁶⁶ Macura S., Farmer B.T., Brown L.R., *J. Magn. Reson.*, **1986**, 70, 493-499.
- ⁶⁷ van Halbeek H., Poppe L., *Magn. Reson. Chem.*, **1992**, 30, S74-S86.

CAPITULO 3

**ESTRUCTURA Y DINÁMICA POR
MODELIZACIÓN MOLECULAR**

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 MODELIZACIÓN MOLECULAR

Idealmente, el marco teórico apropiado para el estudio de las biomoléculas, como para cualquier sistema físico-químico, es la mecánica cuántica. Desafortunadamente el principal problema es el tremendo coste computacional que suponen los cálculos cuánticos, aún en sistemas de pocos átomos, lo que hace que la mayoría de problemas de interés bioquímico, que implican la consideración de cientos de átomos, sean prácticamente inabordables mediante dicha metodología.

Los métodos de “campos de fuerzas” (mecánica molecular) presentan la principal ventaja de reducir considerablemente el coste computacional a costa de asumir una serie de aproximaciones o hipótesis que generalmente son válidas para la mayoría de los sistemas de interés, siempre que no estemos interesados en propiedades moleculares que requieran un conocimiento de las distribuciones electrónicas (reacciones de roturas y formaciones de enlace; Diels-Alder,..., etc). La primera, y más importante, de estas aproximaciones es la *aproximación de Born-Oppenheimer* (las descripciones de los movimientos nucleares y electrónicos son independientes y separables). Fundamentada en esta hipótesis, la mecánica molecular, por tanto, se centra en el estudio de los movimientos nucleares, asumiendo que las propiedades moleculares de interés (energía,..., etc) se van a derivar del conocimiento de las $3N$ coordenadas cartesianas espaciales de los núcleos que constituyen nuestro sistema.

3.1.1.1 Campo de fuerzas. Parametrizaciones para carbohidratos.

La esencia de la mecánica molecular está en la función matemática que da la energía de la molécula conocidas las $3N$ coordenadas espaciales atómicas (x_i, y_i, z_i). Dicha función recibe el nombre de *Campo de Fuerzas*. La mecánica molecular es una metodología con una base empírica, por lo que todos los campos de fuerzas requieren de la inclusión de determinados parámetros

obtenidos experimentalmente o por métodos mecanocuánticos para los sistemas con los que estemos trabajando.

La expresión matemática general para un campo de fuerzas es:

$$E_{Pot} = \sum_{\text{enlaces}} V_{ent} + \sum_{\text{ángulos}} V_{ang} + \sum_{\text{diedros}} V_{died} + \sum_{NB} V_{NB} + \sum_{\text{elect}} V_{elec} \dots$$

donde cada término da cuenta, respectivamente, de: energía de deformación de enlaces ($\sum_{\text{enlaces}} V_{ent}$); energía de deformación de ángulos de enlace ($\sum_{\text{ángulos}} V_{ang}$); energía de torsión, o deformación de ángulos diedros ($\sum_{\text{diedros}} V_{died}$); energía de las interacciones de no-enlace ($\sum_{NB} V_{NB}$); y energía de las interacciones electrostáticas ($\sum_{\text{elect}} V_{elec}$).

Cada uno de estos términos tiene un desarrollo matemático determinado que puede diferir entre distintos campos de fuerzas, dependiendo del nivel de precisión de éstos. Por ejemplo, para el campo de fuerzas AMBER, utilizado en esta tesis:

$$E_{total} = \sum_{\text{bonds}} K_R (R - R_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] + \sum_{\text{H-bonds}} \left[\frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right]$$

En la **figura 3.1.1** se representan las distintas contribuciones energéticas de un campo de fuerzas genérico.

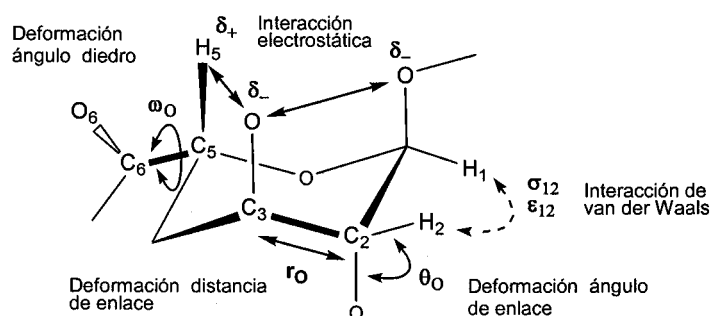


Figura 3.1.1 Representación esquemática, sobre un anillo de ácido α -L-idopiranosilurónico, de las contribuciones claves en un campo de fuerzas de mecánica molecular.

El conjunto de valores r_0 , θ_0 , ω_0 , σ_{ij} , ϵ_{ij} constituyen los *parámetros* o datos de referencia para el cálculo de la energía potencial molecular correspondiente a un estado conformacional cualquiera. La parametrización propia de cualquier campo de fuerzas debe ser considerada muy especialmente al iniciar cualquier estudio de modelización molecular, a fin de asegurar la “transferibilidad” de dichos parámetros para nuestro sistema objeto de estudio. Es decir, debemos asegurarnos que los elementos característicos de nuestro sistema a estudiar (grupos funcionales, efectos estereoelectrónicos, etc...) estén suficientemente bien representados por los modelos, generalmente pequeños, que se hayan utilizado para la generación de los parámetros de dicho campo de fuerzas.

Entre los factores importantes que debe tener en cuenta un campo de fuerzas para la modelización de carbohidratos están los característicos efectos anomérico y exo-anomérico. El efecto anomérico (también denominado endo-anomérico), propuesto por Lemieux¹, se refiere a la preferencia que muestra cualquier sustituyente electronegativo en el carbono 1 de un anillo de piranosa por una configuración axial (**figura 3.1.2**), en contra de lo que cabría esperar basándose en criterios estéricos solamente.

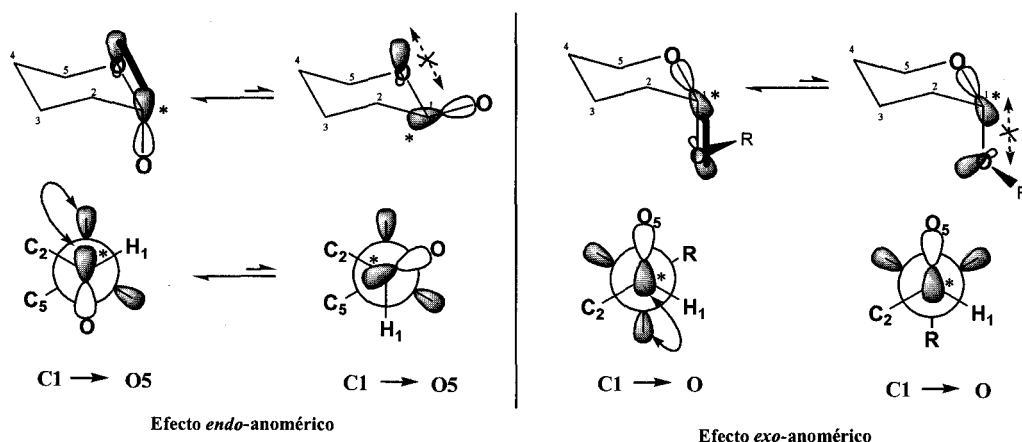


Figura 3.1.2 Representación esquemática del origen electrónico de los efectos *endo*- y *exo*-anomérico.

De la misma naturaleza, el efecto *exo*-anomérico² se manifiesta como una preferencia del enlace exocíclico C1 – O por adoptar una orientación *gauche* (**figura 3.1.2**). Un modelo elegante para el origen de estos efectos lo proporciona la teoría de los orbitales moleculares frontera, sugiriendo que dicha estabilización anomérica surge como consecuencia del solapamiento favorable entre el orbital tipo sp^3 que aloja un par de electrones solitario de un átomo de oxígeno y el orbital molecular antienlazante σ^* del enlace C – O adyacente (**figura 3.1.2**).

Los campos de fuerzas que se han utilizado en el análisis conformacional de oligosacáridos, y que, por lo tanto incluyen un término en el potencial para dicho efecto *exo*-anomérico, se han dividido tradicionalmente en dos grupos, que suponen dos filosofías distintas. El primer grupo asume que la conformación del oligosacárido está determinada exclusivamente por las interacciones de van der Waals. Esta aproximación se ha denominado “modelo de esferas duras”, debido a las fuertes repulsiones estéricas que resultan en los cálculos. El campo de fuerzas correspondiente se denomina HSEA (*Hard Sphere Exo-Anomeric*)^{3,4}.

En el segundo grupo de campos de fuerzas aplicados a carbohidratos la energía potencial se expresa como la suma de las contribuciones energéticas de las deformaciones de distancia de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros, así como de las interacciones de no-enlace. Dentro de esta categoría caen los campos de fuerzas conocidos como “macromoleculares”, y, para muchos de ellos, se han publicado extensiones de parámetros para carbohidratos, como por ejemplo CHARMM^{5,6}, GROMOS⁷. También han sido empleados en simulaciones de dinámica molecular de oligosacáridos los campos de fuerzas de propósito-general tales como CVFF^{8,9}, y TRIPOS 5.2¹⁰. Para este último se han derivado parámetros adicionales para el análisis conformacional de carbohidratos, por Imberty et al.¹¹. Los campos de fuerzas MM2 y MM3 fueron inicialmente diseñados para hidrocarburos, pero hoy día son aplicables a una amplia variedad de moléculas^{12,13}. Tvaroska y Pérez publicaron una versión denominada MM2CARB¹⁴, para su uso en modelización de carbohidratos.

De interés para esta tesis resultan las distintas parametrizaciones para oligosacáridos implementadas en el marco del campo de fuerzas AMBER^{15,16}, inicialmente diseñado para la simulación de proteínas y ácidos nucleicos. Homans añadió un término torsional para el efecto exo-anomérico a los parámetros tipo-CHARMM⁶ y lo incorporó dentro de AMBER¹⁷. Estos parámetros han sido utilizados para diversas simulaciones, tanto en vacío como con la inclusión de disolvente explícito^{18,19,20}. Por otro lado, Glennon et al.²¹ presentaron un campo de fuerzas basado en AMBER, especialmente para monosacáridos y polisacáridos con uniones 1→4, proponiendo cargas parciales atómicas específicas de monosacáridos, pero sin incluir ningún término torsional nuevo. Una de las principales desventajas que presenta la parametrización de Homans, y, por tanto todas las variaciones basadas en su término torsional, es que estos parámetros se han mostrado solamente adecuados para la reproducción de datos experimentales cuando las simulaciones de dinámica molecular se llevan a cabo con la inclusión de restricciones que fuercen al sistema hacia dichos datos.

Este problema parece haber quedado satisfactoriamente resuelto con la reciente parametrización extensa de AMBER, llevada a cabo por Woods et al., para las simulaciones de dinámica molecular de glicoproteínas y oligosacáridos, denominada GLYCAM²². En esta parametrización, los términos torsionales se ajustaron a las energías rotacionales *ab-initio* al nivel HF/6-31G* para derivados del 2-metoxi-tetrahidropirano. Evidentemente, estas moléculas reflejan de forma más precisa las propiedades de los enlaces glicosídicos en piranósidos, en comparación con los términos torsionales de Homans, que fueron derivados para el dimetoximetano. Los resultados obtenidos hasta ahora con AMBER-GLYCAM, indican que dicha parametrización produce resultados a partir de simulaciones sin restricciones que concuerdan con los datos experimentales.

3.1.1.2 Minimización energética. Métodos de búsqueda conformacional.

Una vez determinado el campo de fuerzas adecuado para nuestro sistema, es posible evaluar la energía potencial molecular, para una conformación determinada inicial. En general, la forma en la que varía la energía viene dada, excepto para sistemas muy muy simples, por una complicada función multidimensional de las $3N$ coordenadas cartesianas, o de las $3N-6$ coordenadas internas, que es denominada, normalmente, como *superficie de energía potencial* (o *hipersuperficie*). Lógicamente, los estados estables del sistema se identifican con los mínimos que se pueden localizar sobre dicha superficie. Para la localización de dichos mínimos recurrimos al uso de un determinado algoritmo de “minimización energética”. Estos algoritmos (“descenso pronunciado”, “gradientes conjugados”, ...) permiten ir disminuyendo progresivamente el contenido energético de una determinada estructura variando sistemáticamente las coordenadas atómicas hasta alcanzar un mínimo relativo. No obstante, para moléculas con un elevado número de grados de libertad, el principal problema surge de la probabilidad de existencia de múltiples mínimos, unido al hecho de que normalmente el algoritmo de minimización sólo puede avanzar en la dirección de menor energía, por lo que el mínimo que se alcance dependerá, lógicamente, de la estructura de partida elegida.

Para resolver este problema de “múltiples mínimos” sobre la superficie de energía potencial, se debe conseguir una búsqueda conformacional lo más extensa posible. Esto se puede llevar a cabo mediante métodos de búsqueda estocásticos, o mediante métodos de búsqueda sistemática. Entre los primeros, el más ampliamente utilizado es el método de Metropolis Monte Carlo (MMC). Esencialmente consiste en generar configuraciones del sistema de forma aleatoria, mediante la variación de aquellos grados de libertad que se consideren más relevantes para la molécula objeto de estudio, y aplicar criterios energéticos especiales para aceptar o rechazar una determinada configuración nueva. Si este procedimiento es aplicado un número de etapas que se pueda considerar estadísticamente grande, se genera un colectivo en el que cada conformación presente ocurrirá de acuerdo con su factor de probabilidad de Boltzmann. Simulaciones de tipo MMC permiten la obtención de propiedades moleculares promediadas en colectivo (espacio configuracional), pero, si queremos obtener propiedades dinámicas del sistema (espacio de fases) deberemos recurrir a otras técnicas de simulación estadísticas, tales como la dinámica molecular.

La aplicación de los métodos sistemáticos de búsqueda conformacional para carbohidratos suele basarse en la suposición de que la estructura tridimensional (conformación global) de un oligosacárido viene principalmente determinada por las orientaciones de los enlaces glicosídicos individuales, lo cual es cierto para la mayoría de oligosacáridos, cuyos anillos constituyentes suelen ser relativamente rígidos bajo condiciones no reactivas, siendo los grupos exocíclicos los principales puntos de flexibilidad. Esto, no obstante, no siempre es cierto, como veremos en el estudio de los hexasacáridos modelos de heparina objetos de la presente tesis.

Bajo la suposición de rigidez de los residuos que forman parte de un determinado enlace glicosídico, la geometría global de los conformeros de baja energía va a depender principalmente, pues, de las rotaciones en torno a los enlaces glicosídicos (Φ, Ψ), donde $\Phi \equiv \text{H1}'\text{-C1}'\text{-O-C4}$ y $\Psi \equiv \text{C1}'\text{-O-C4-H4}$ (véase figura 2.1.2; capítulo 2) ya que las diferentes orientaciones de los grupos

sustituyentes tienen una influencia limitada sobre el espacio conformacional del disacárido²³. Esto quiere decir que el espacio conformacional accesible a un determinado disacárido puede ser explorado eficientemente mediante la variación sistemática de dichas torsiones, en pequeños incrementos $\Delta\alpha$ sobre el intervalo total de 360° . Una vez generado de esta forma el colectivo de conformeros que constituyen todo el espacio conformacional (Φ, Ψ) , podemos proceder fundamentalmente de 3 formas distintas, para la obtención de otros tantos tipos de mapas energéticos diferentes, aunque *grosso modo* ofrezcan la misma información. Estos son, por orden de coste computacional: mapas “rígidos”, mapas “relajados”, y mapas “adiabáticos”, de energía potencial.

Los mapas rígidos de energía potencial se obtienen simplemente calculando la energía de cada uno de los conformeros de dicho colectivo (Φ, Ψ) , mediante la expresión del campo de fuerzas adecuado. Esta es la esencia del campo de fuerzas de esferas duras (HSEA), ya que los residuos son tratados como rígidos, y los grupos exocíclicos se mantienen fijados. Esta fue la aproximación seguida en los trabajos pioneros sobre el análisis conformacional de carbohidratos²⁴. Uno de los defectos principales de esta aproximación es la aparición de interacciones estéricas importantes entre distintos grupos exocíclicos para determinados valores de (Φ, Ψ) que no pueden ser relajadas y que, por tanto, suponen un súbito incremento de la energía. Hoy día, esta aproximación solo se justifica para la obtención de geometrías iniciales libres de impedimentos estéricos importantes, para la posterior realización de estudios de modelización con mayor precisión.

En los mapas relajados de energía potencial, las tensiones estéricas comentadas anteriormente son eliminadas por la inclusión de una segunda etapa de optimización geométrica completa en la que se permite la relajación energética de todos los grados de libertad, excepto las torsiones “directoras” (Φ, Ψ) . Durante el proceso de minimización energética, los grupos exocíclicos se moverán hacia el mínimo más próximo, en la dirección de energía decreciente. De esta forma, los mapas relajados describen más ampliamente la superficie de

energía potencial accesible, disminuyen las barreras entre mínimos relativos, y localizan mínimos de energía mucho más baja que la/s estructura/s de partida.

Esta mejora en la descripción de la superficie de energía potencial en la metodología de mapas relajados, ha ido paralelamente acompañada, a su vez, por un perfeccionamiento progresivo de los términos empíricos de los distintos campos de fuerza, así como la generación de parámetros específicos para carbohidratos de precisión creciente, como se ha discutido anteriormente. En este sentido, Perez et al.²³, han llevado recientemente a cabo un estudio de análisis de componentes principales (PCA) sobre 20 campos de fuerzas aplicados a unos modelos particulares de carbohidratos, considerados como “tests”, (mono- y disacáridos), campos de fuerzas entre los que se encontraban AMBER-GLYCAM, y TRIPOS-PIM, que son los empleados en esta tesis. Estos autores llegan a la conclusión de que en general todos los campos de fuerza probados coinciden razonablemente en la identificación de los conformeros de baja energía de las uniones disacáridicas. Sin embargo, demostraron que las discrepancias más significativas se pueden producir en las energías relativas de dichos mínimos, encontrándose una fuerte dependencia del conjunto de parámetros utilizado.

A pesar de la mayor eficacia en la localización de las regiones de mínima energía de los mapas relajados, éstos presentan aún el problema de “múltiples mínimos”. Para un punto dado (Φ, Ψ) del espacio conformacional descrito por el mapa relajado es posible que se puedan producir aún conformaciones de más baja energía por rotación de los grupos exocíclicos. Idealmente, para la construcción de este tipo de mapas, denominados mapas adiabáticos, sería necesario llevar a cabo una investigación exhaustiva de todas las posibles combinaciones de orientaciones de todos los grupos exocíclicos presentes. Si asumimos que cada grupo exocíclico presente puede encontrarse mayoritariamente en cada una de las tres conformaciones “alternadas”, habría que generar 3^N conformaciones diferentes para cada punto del espacio (Φ, Ψ) , siendo N el número de grupos exocíclicos. Para un simple disacárido esto da lugar a 3^{12} (531441) conformaciones, mientras que, para un disacárido que contenga un anillo de

ácido L-idurónico (como los que constituyen los hexasacáridos que se presentan en esta tesis) esto supondría considerar 3^{19} ($1.16 \cdot 10^9$) conformaciones posibles.

Evidentemente, un estudio de mapas adiabáticos exhaustivo resultará en un excesivo tiempo computacional, lo que lo hace práctico solamente en casos de carbohidratos de un tamaño y flexibilidad limitados. En la bibliografía se recogen estudios de mapas adiabáticos en los que la estrategia para reducir el coste computacional consiste en considerar solamente las orientaciones más estables de los grupos hidroximetilo presentes (*gg*, *tg*, o *gt*), así como aquellas disposiciones de grupos hidroxilo que de lugar a un mayor nº de enlaces de hidrógeno²⁵. Para ello, los hidroxilos secundarios se orientan bien en sentido de las manecillas del reloj, bien en sentido contrario (visto desde arriba del plano del anillo de piranosa). Este tipo de aproximaciones constituye una de las formas más eficaces de reducir el coste computacional, manteniendo la seguridad de que se exploraran las configuraciones del sistema de mayor sentido físico-químico. Aún así, incluso con la potencia de cálculo disponible en la actualidad, una búsqueda conformacional de este tipo es inaplicable a oligómeros superiores.

3.1.1.2. Simulaciones de dinámica molecular de oligosacáridos

Los datos obtenidos por espectroscopía de RMN representan, en realidad, valores promediados sobre todo el colectivo de moléculas en el tubo de medida, y sobre el tiempo en el que se realiza la medida. Para la obtención teórica de dichos valores y estudiar al mismo tiempo diversos procesos a un nivel molecular, podemos hacer uso de la metodología de dinámica molecular. De acuerdo con la *hipótesis ergódica*, supuesto que el tiempo de simulación es suficientemente largo como para muestrear todas las conformaciones relevantes del sistema, la simulación de una simple molécula con su entorno permite obtener propiedades moleculares promediadas en el tiempo que se aproximan suficientemente bien a los valores promediados en colectivo que son observables experimentalmente.

Para llevar a cabo una simulación de dinámica molecular aplicamos la ecuación de la segunda Ley de Newton del movimiento, para cada una de las partículas que constituyen el sistema, donde las fuerzas que actúan se derivan del campo de fuerzas de mecánica molecular (V):

$$\frac{dv_i}{dt} = F_i / m_i \quad -\frac{dV}{dr_i} = F_i$$

Debido a la naturaleza continua de los potenciales de interacción la integración de las ecuaciones del movimiento tiene que ser escindida en una serie de etapas infinitesimales, con tiempos de integración (Δt) del orden de femtosegundos, para poder asegurar la conservación de la energía del sistema. En cada etapa se calculan las fuerzas sobre cada uno de los átomos, se combinan con las posiciones y velocidades actuales, y se generan nuevas posiciones y velocidades tras el incremento temporal Δt .

De esta forma, una simulación de dinámica molecular genera una *trayectoria* que describe como las variables dinámicas del sistema cambian con el tiempo. Tiempos totales de simulación están típicamente en el orden de decenas de picosegundos, a varios nanosegundos, dependiendo, obviamente, del tamaño del sistema estudiado, así como de la potencia de cálculo disponible y de la eficiencia del algoritmo de cálculo empleado.

A partir de las trayectorias de dinámica molecular, podemos obtener los promedios termodinámicos de cualquier propiedad molecular, A , en la que estemos interesados, como promedios temporales (hipótesis ergódica):

$$\langle A \rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M A \left(\begin{matrix} \vec{r}^N \\ \vec{p}^N \end{matrix} \right)$$

3.1.2 ANTECEDENTES DE GLICOSAMINOGLICANOS

La determinación de la estructura tridimensional de glicosaminoglicanos, como para otros carbohidratos complejos, se fundamenta en la combinación de los datos experimentales de RMN con las predicciones teóricas de la mecánica molecular. Uno de los primeros problemas que surgen para la aplicación de ésta última a los GAGs es el hecho de que los campos de fuerzas existentes no siempre proporcionan parámetros para carbohidratos sulfatados. En la literatura se encuentran algunas parametrizaciones especializadas para el campo de fuerzas MM2^{26,27}, y para los campos de fuerzas AMBER y CHARMM²⁸. Algunos grupos han aplicado con éxito el campo de fuerzas CVFF²⁹ para carbohidratos, pero algunos autores han encontrado que dichos parámetros reproducen muy pobremente la geometría del grupo sulfato³⁰. Para oligosacáridos tipo heparina, Mulloy et al.³¹ han aplicado el campo de fuerzas MM2, mientras que Mikhailov et al.³² han utilizado el campo ESFF.

3.1.2.1 Mapas relajados de GAGs

En la bibliografía se recogen estudios de mapas relajados de energía (Φ, Ψ) correspondientes a las uniones glicosídicas GlcN-IdoA e IdoA-GlcN, para la heparina natural y derivados químicamente modificados³¹, así como para un tetrasacárido y un hexasacárido obtenidos por despolimerización enzimática del producto natural³². La combinación de estos mapas con las observaciones de determinados patrones distintivos de NOEs interresiduales intensos, han llevado en todos los casos a conclusiones similares: todos los derivados, sin tener en cuenta el patrón de sustitución, presentan conformaciones similares en torno a los enlaces glicosídicos, encontrándose sólo diferencias en lo concerniente al equilibrio conformacional de sus residuos de ácido L-idurónico³⁰. Esto ha sido interpretado en términos de una relativamente inusual "rigidez" de las torsiones glicosídicas presentes en este tipo de compuestos, siendo los anillos de ácido L-idurónico, las zonas que presentan mayor flexibilidad local, como consecuencia del equilibrio conformacional anular. En este sentido, la heparina no se puede

considerar ni más ni menos flexible en comparación con otros oligosacáridos si no, más bien, "*diferentemente flexible*"³⁰.

Es precisamente la "plasticidad" conformacional de los anillos de ácido L-idurónico el aspecto más controvertido en términos de modelización molecular. Los primeros cálculos de mecánica molecular realizados por Ragazzi et al.³³ sobre el monosacárido (metil glicósido del ácido α -L-idurónico sulfatado en la posición 2) con el campo de fuerzas MM2, en vacío, y sin la consideración del término electrostático, indicaron que las formas 1C_4 , 2S_0 , y 4C_1 , existen como mínimos energéticos bien definidos de valores de energía similares, y estas conclusiones se extendieron posteriormente al caso de oligosacáridos, en los que el anillo es un residuo interno³⁴. Estos resultados constituyen la base para la interpretación de los datos de RMN en términos de un equilibrio entre estas tres conformaciones. No obstante, estos cálculos no aportan información alguna sobre la dinámica interna de estos residuos. Esta información puede ser obtenida mediante simulaciones de dinámica molecular.

3.1.2.2 Formalismo de Cremer-Pople de las coordenadas de plegamiento

El análisis de las distintas conformaciones anulares que se pueden generar con métodos estadísticos de simulación como el método de Monte Carlo, o el método de dinámica molecular requiere disponer de alguna forma de seguir el curso conformacional del anillo de piranosa a lo largo de la simulación. Evidentemente, la conformación del anillo está completamente definida por el conjunto de sus coordenadas cartesianas. Sin embargo, esta representación tiene claramente poco valor descriptivo.

El formalismo de las coordenadas de plegamiento (*puckering*) de Cremer-Pople³⁵ constituye para los anillos de piranosa un método muy eficaz de reducir el relativamente elevado número de coordenadas cartesianas a un simple conjunto de tres coordenadas esféricas: Q , θ , y ϕ_2 . (**figura 3.1.3**). Estos parámetros pueden ser fácilmente visualizados en términos de las conformaciones de silla-bote-bote torcido. El parámetro Q , es la máxima

amplitud del plegamiento, y se corresponde con las desviaciones cuadráticas medias de las posiciones de los 6 átomos del anillo respecto del plano medio de éste. Los parámetros θ y ϕ_2 son los ángulos ($0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$; $0^\circ \leq \phi_2 \leq 360^\circ$) polar y azimutal, respectivamente, de la esfera de radio Q . Las conformaciones ideales de silla 4C_1 y 1C_4 se corresponden con los valores de θ de 0° y 180° , respectivamente, por lo que constituyen los polos, norte y sur, de la esfera de plegamiento. En el ecuador (**figura 3.1.3**), donde $\theta = 90^\circ$, existen 6 botes (3,0B , $B_{1,4}$, ${}^{2,5}B$, $B_{3,0}$, ${}^{1,4}B$, y $B_{2,5}$) y seis botes torcidos (3S_1 , 5S_1 , 2S_0 , 1S_3 , 1S_5 , y 0S_2). La interconversión entre cualesquiera de ellos recibe el nombre de "pseudorrotación".

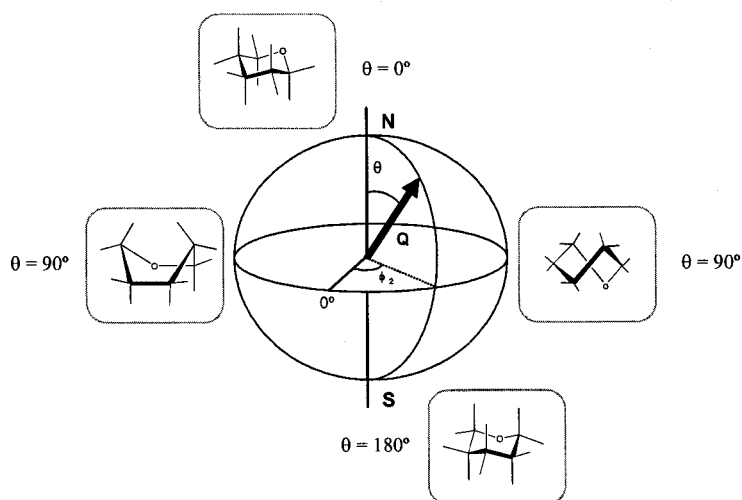


Figura 3.1.3 *Coordenadas de plegamiento de Cremer-Pople. Debido al mayor plegamiento de las conformaciones de bote/bote torcido la esfera se presenta un poco achatada por los polos.*

Los valores de ϕ_2 que corresponden a un determinado conformero del itinerario pseudorrotacional representado en la **figura 3.1.4** dependen de la numeración que se adopte para los átomos de carbono del anillo en dicho formalismo. Así, para la compatibilización con los valores presentados por Cremer y Pople para la sacarosa³⁵, y por Forster et al.³⁶ en un estudio del ácido L-idurónico por dinámica molecular, la numeración 1-6 de los átomos en dicho

formalismo debe hacerse en el orden O5, C1, C2, C3, C4, y C5. Con esta convención, el bote torcido presenta un valor de $\phi_2 = 150^\circ$. Sin embargo, en el trabajo de Ragazzi et al.³³, la elección de otra secuencia de átomos les llevó a dar un valor de $\phi_2 = 270^\circ$ para dicho conformero.

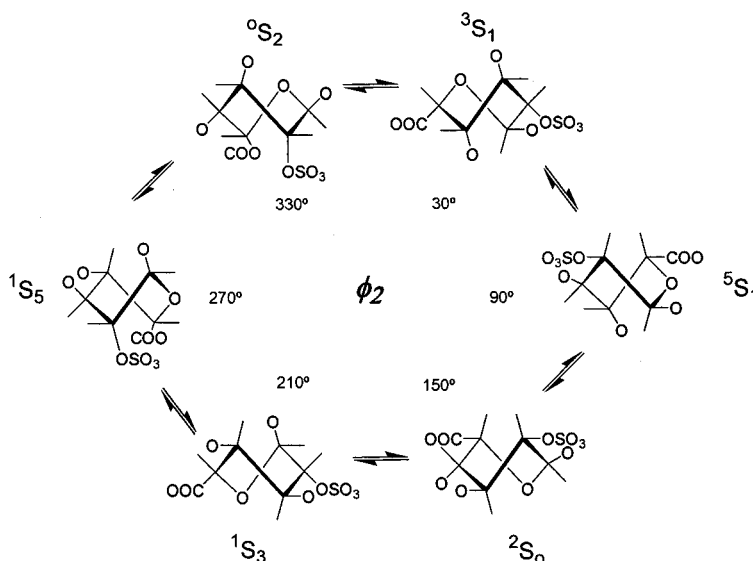


Figura 3.1.4 Itinerario pseudorrotacional para anillos de L-IdoA en el ecuador ($\theta = 90^\circ$) de la esfera de plegamiento de Cremer-Pople. Por simplicidad se han representado solamente las conformaciones de bote torcido, energéticamente más favorables.

3.1.2.3 Simulaciones de GAGs. El problema del equilibrio pseudorrotacional

Sorprendentemente, el número de simulaciones de dinámica molecular de oligo-/polisacáridos que contienen ácido L-idurónico (heparina, sulfato de heparano, sulfato de dermatano) que podemos encontrar en la bibliografía es tremendamente escaso.

Por un lado, Forster et al.³⁶ llevaron a cabo un estudio de dinámica molecular sobre dicho residuo, sin sulfatar, en dos entornos químicos distintos, como monosacárido (metil glicósido), y como residuo interno en un trisacárido, con el campo de fuerzas AMBER-Homans³⁷. Las simulaciones se realizaron *in vacuo* (con distintas consideraciones para ϵ) y con la inclusión de agua explícita TIP3P. Los autores observaron que en cada una de las simulaciones que llevaron a cabo, tanto en vacío, como en agua explícita, el anillo presentó un movimiento pseudorrotacional muy extenso, en el cual se producía la interconversión entre distintas formas de bote y bote torcido, reduciéndose el rango de variación en la coordenada ϕ_2 a la mitad, aproximadamente, cuando el anillo constituía el residuo interno de un trisacárido, respecto al monosacárido. Sobre la base de estos datos, concluyeron que la movilidad conformacional de los anillos de L-iduronato tanto en azúcares simples como en polisacáridos complejos, podría ser más extensa y más rápida de lo que se pensaba.

Por otro lado, en la bibliografía podemos encontrar un estudio de dinámica molecular en agua explícita, con el campo de fuerzas AMBER-Homans, de un hexasacárido tipo heparina que contiene residuos de ácido L-idurónico 2-O-sulfatados^{32b}. No obstante, dicho estudio se centró fundamentalmente en la estabilidad de la estructura molecular global obtenida por refinamiento mediante mecánica molecular con inclusión de restricciones de distancias obtenidas a partir de los datos de NOE mediante la aproximación de la matriz de relajación iterativa (IRMA). Sin embargo, en las dinámicas moleculares sin la inclusión de dichas restricciones, estos autores observaron inestabilidades en el sistema que se tradujeron en conformaciones anómalas de los anillos de D-glucosamina, así como conformaciones alternativas a la 2S_0 para los anillos de L-iduronato.

3.2 OBJETIVOS

El principal objetivo de este capítulo es hacer uso de las técnicas teóricas de modelización molecular disponibles, tales como la búsqueda de mínimos energéticos y las simulaciones de dinámica molecular, para encontrar modelos moleculares teóricos compatibles con los datos experimentales recogidos en el apartado anterior, y que nos permitan refinar en la medida de lo posible las estructuras tridimensionales de los hexasacáridos 1, 2, 3, y 4.

La escasez de resultados teóricos, especialmente de simulaciones de dinámica molecular, de glicosaminoglicanos que contienen anillos de ácido L-idurónico, así como la controversia suscitada por dichos resultados en relación con la flexibilidad pseudorrotacional de dichos anillos, han hecho que entre los objetivos importantes enmarcados en esta tesis doctoral se encuentre también la investigación del comportamiento dinámico de los residuos de L-iduronato presentes en los hexasacáridos 1-4.

El conjunto total de resultados (y discusión) que se presenta a continuación se puede considerar dividido en dos bloques, precisamente como consecuencia de la aplicación de las dos metodologías.

En una primera parte se presentan los datos de mecánica molecular (mapas relajados de energía) correspondientes a los distintos tipos de uniones glicosídicas que se encuentran en los 4 hexasacáridos. Su finalidad es la obtención de las regiones (Φ, Ψ) energéticamente favorables y compatibles con los datos de RMN.

En la segunda parte, se analiza la estabilidad de las estructuras derivadas del estudio de mapas, mediante simulaciones de dinámica molecular. Es en esta parte donde se presenta un estudio del efecto de las distintas aproximaciones utilizadas para las simulaciones, sobre el comportamiento dinámico de los residuos de ácido L-idurónico.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 CÁLCULO DE MAPAS RELAJADOS (Φ, Ψ)

El primer aspecto estructural que se decidió abordar mediante modelización molecular fue la geometría en torno a los enlaces glicosídicos, a través del cálculo de mapas (Φ, Ψ). La elección de esta técnica para iniciar el estudio teórico de las estructuras de estos hexasacáridos, a pesar de los inconvenientes que se discuten posteriormente, se basó en varios aspectos. En primer lugar con poco coste computacional obtenemos información de valor acerca de las regiones (Φ, Ψ) energéticamente favorables, y que, por tanto, deberán estar mayormente pobladas. En segundo lugar, la superposición de las curvas de distancias correspondientes a NOEs exclusivos en dichos mapas nos permite una primera comparación entre datos teóricos y experimentales (NOEs) que descartará conformaciones no detectadas experimentalmente, lo que reducirá considerablemente el espacio configuracional accesible, permitiendo una mayor definición del sistema.

No obstante, es importante resaltar que no se han calculado mapas “adiabáticos” de energía, que son los que permiten calcular distribuciones de probabilidad a una determinada temperatura, así como obtener determinados observables de RMN. Esto es debido, por un lado, a que las energías calculadas corresponden a modelos disacáridicos, y no son aditivamente extrapolables a los hexasacáridos. Por otro lado, el carácter multiconformacional del anillo de L-iduronato haría que el número de microestados a considerar para el cálculo se elevase considerablemente, ya que no bastaría solamente con la consideración de las orientaciones de los distintos grupos exocíclicos, sino que habría que considerar todas las posibles conformaciones “bote”/“bote-torcido” energéticamente favorables para dicho anillo.

Por lo tanto, el cálculo de mapas se abordó con la exclusiva intención de elucidar si los NOEs experimentales pueden ser traducidos a una geometría bien

definida de los enlaces glicosídicos. Una vez determinada dicha geometría, estudiar la influencia del patrón de sustitución sobre ésta, y finalmente, analizar el grado de concordancia entre los datos (NOEs experimentales y mapas teóricos) de las estructuras de 1-4, y los datos existentes para la heparina natural.

En cuanto a la construcción de los mapas relajados hay que tener en cuenta que los distintos patrones de sulfatación que encontramos en los 4 hexasacáridos originan 9 tipos diferentes de uniones glicosídicas (tabla 3.3.1). Como para cada anillo de L-IdoA hay que considerar las 2 posibilidades conformacionales, 1C_4 y 2S_0 , se construyeron 18 modelos moleculares de disacáridos.

Tipo de unión	Patrón de sustitución	Presente en:
GlcN – IdoA	GlcNS,6S – IdoA·2S	1
	GlcNS – IdoA·2S	2,4
	GlcNAc,6S – IdoA·2OH	2
	GlcNS,6S – IdoA·2OH	3
IdoA – GlcN	IdoA·2S – GlcNS,6S	1
	IdoA·2S – GlcNAc,6S	2
	IdoA·2OH – GlcNS,6S	3
	IdoA·2S - GlcNS	4
	IdoA·2OH -GlcNS	2

Tabla 3.3.1 Los 9 tipos de uniones glicosídicas que se encuentran en los hexasacáridos 1, 2, 3, y 4..

En la figura 3.3.1 se muestran los 8 mapas relajados correspondientes a las uniones GlcN-IdoA, mientras que en la figura 3.3.2 se representan los 10 mapas que corresponden a las uniones IdoA-GlcN. El campo de fuerzas empleado es TRIPOS¹⁰ con el conjunto de parámetros PIM¹¹ para carbohidratos (véase parte experimental), integrado en el paquete de modelado Sybyl. En todos los casos, los ángulos glicosídicos Φ y Ψ se variaron en incrementos de 20° hasta barrer todo el espacio configuracional. Esto origina 324 conformeros por cada mapa.

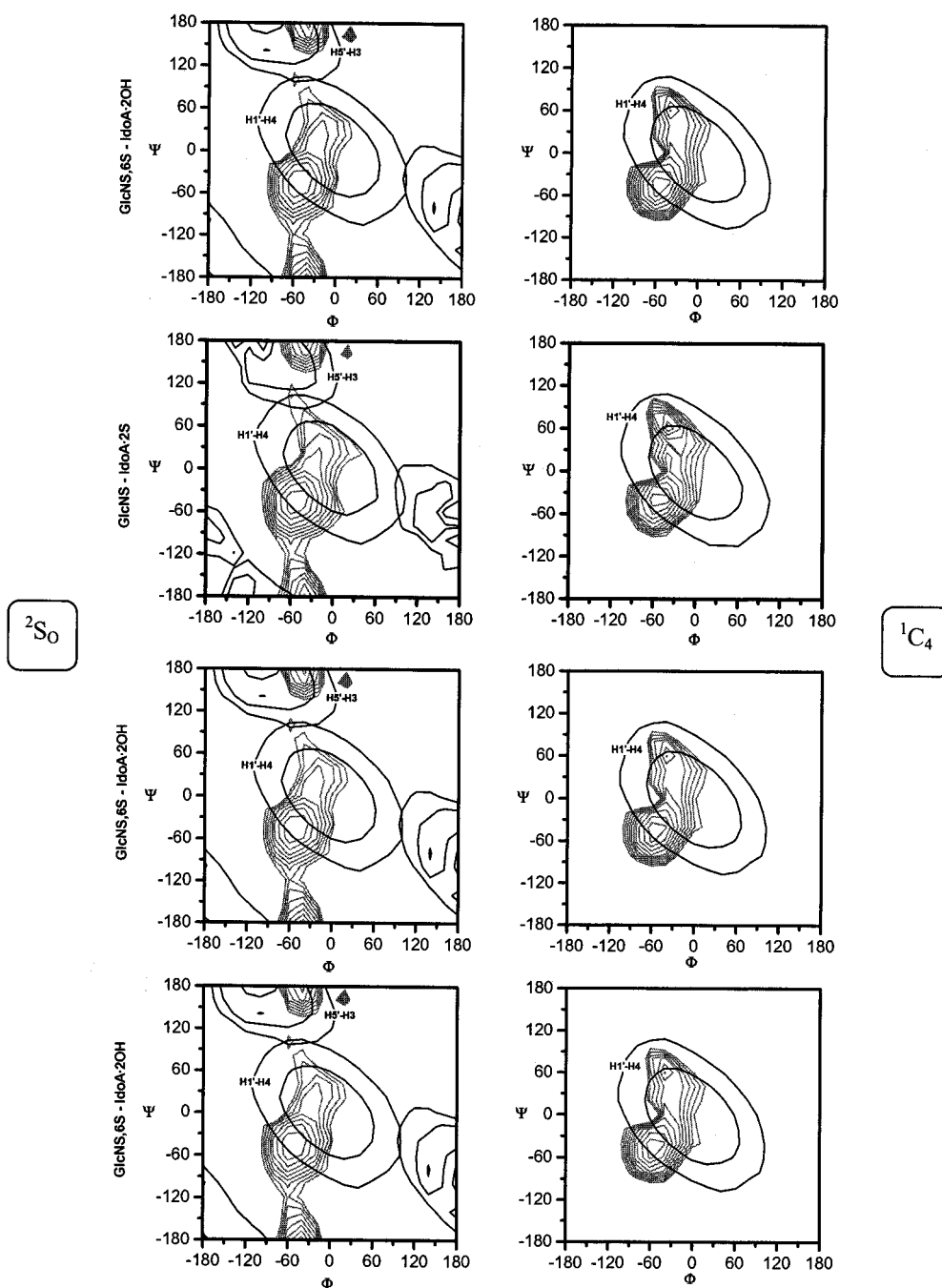


Figura 3.3.1 Mapas relajados y NOEs exclusivos para las uniones glicosídicas “GlcN - IdoA” que se encuentran en los hexasacáridos 1 - 4.

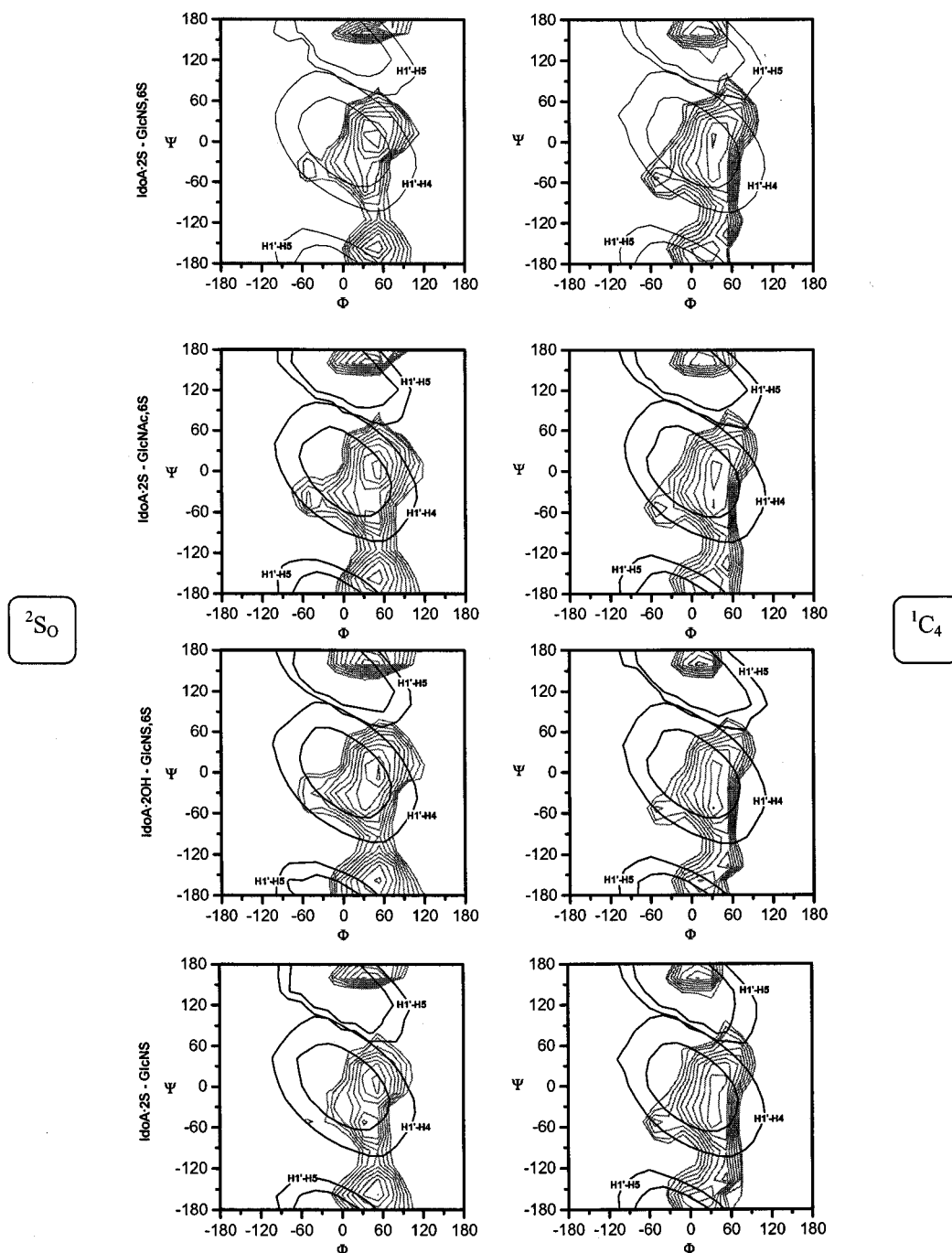


Figura 3.3.2 Mapas relajados y NOEs exclusivos para las uniones glicosídicas "IdoA - GlcN" que se encuentran en los hexasacáridos 1 - 4.

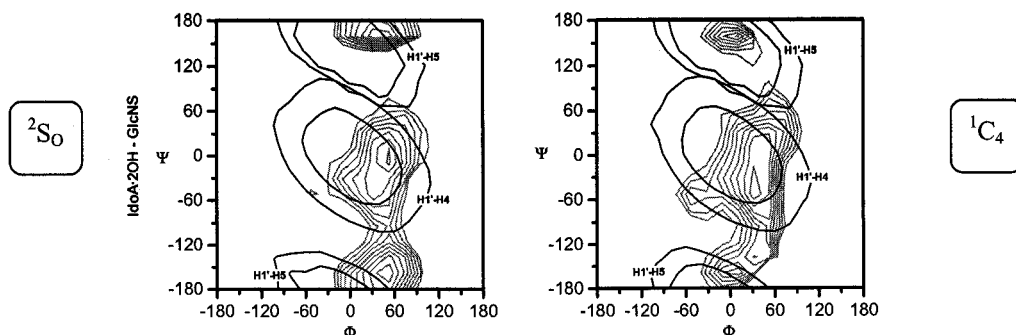


Figura 3.3.2 (Continuación)

Las líneas de nivel de energía están representadas cada 0.5 Kcal/mol, y las curvas de distancias encierran zonas en las que $r_{ij} \leq 3 \text{ \AA}$.

La cuestión de si los distintos sustituyentes de 1-4 tienen algún efecto importante sobre las torsiones que definen los enlaces glicosídicos se puede responder por comparación de cada uno de aquellos mapas energéticos que difieren exclusivamente en el patrón de sustitución (comparación por columnas en las figuras 3.3.1 y 3.3.2). Considerando los errores asociados a las energías para esta metodología se puede afirmar que las topologías de los mapas energéticos son prácticamente independientes del tipo de sustitución de los anillos constituyentes.

Es decir, los resultados de mecánica molecular indican, cualitativamente, que los distintos patrones de sustitución no inducen ningún cambio importante en la geometría de las torsiones glicosídicas de estos 4 hexasacáridos modelos de heparina, por lo que, en principio, no cabe esperar cambio importante alguno en las geometrías moleculares globales de éstos. El espacio conformacional (Φ, Ψ) accesible a estas torsiones glicosídicas se ve escasamente influenciado por los distintos tipos de sustituyentes de los anillos de D-GlcN y L-IdoA.

Como ya se ha comentado, nuestro principal interés se centró en definir lo mejor posible, al menos cualitativamente, cuál es el espacio conformacional accesible energéticamente a las torsiones glicosídicas y compatible con los datos

experimentales. Esto requiere la comparación de los NOEs interglucosídicos observados (capítulo 2, **tabla 2.3.7**) con las predicciones de los mapas. En el capítulo anterior ya se hizo una discusión de dichos NOEs interglucosídicos, pero aquí se pretende desarrollar un más extensamente el razonamiento que nos llevó a dicha discusión, tratando de determinar si los restantes datos de NOEs nos permiten precisar un poco más cuál es la región (Φ, Ψ) más poblada.

En primer lugar, para cada uno de los 9 tipos de uniones presentes la observación del NOE H1'-H4, y la ausencia de NOEs característicos de mínimos energéticos *anti- Ψ* (H5'-H3 para GlcN-IdoA, y H1'-H5 para IdoA-GlcN, véase **figura 3.3.1** y **figura 3.3.2**) confirman que la disposición geométrica de estos enlaces es mayoritariamente *syn- Ψ* . Esta conclusión es independiente del estado conformacional del anillo de L-IdoA, como se puede comprobar por la similitud de las curvas de isodistancia correspondientes a NOEs exclusivos para la silla 1C_4 y para el bote torcido 2S_0 (**figura 3.3.1** y **figura 3.3.2**).

El hecho de que los cálculos predigan la existencia de mínimos *anti- Ψ* que no son observables experimentalmente, merece una pequeña discusión, que, además, justifica el hecho de que no estemos interesados en una cuantificación energética de los distintos mínimos. Primeramente, estos modelos disacarídicos mimetizan relativamente bien el comportamiento de los enlaces glucosídicos en las proximidades de un mínimo. Sin embargo, las conclusiones que se puedan extraer en relación a posibles transiciones conformacionales entre distintos mínimos, especialmente las que supongan grandes cambios en los valores (Φ, Ψ), como *syn- Ψ* \leftrightarrow *anti- Ψ* , no pueden ser directamente trasladables a oligosacáridos superiores (más de dos residuos), ya que, en estos últimos, éstas se verán fuertemente afectadas por el incremento de masa que supone la elongación de la cadena, así como posibles efectos de largo alcance (estructura terciaria), que serán dependientes de las conformaciones de los enlaces glucosídicos subsiguientes. Es decir, mínimos energéticos locales para unidades disacarídicas puede que no sean tales mínimos, o que no estén accesibles, cuando el dímero esté formando parte de una cadena de mayor longitud.

Por otro lado, todos los mapas se han calculado haciendo uso de un tratamiento “in-vacuo” con una constante dieléctrica elevada ($\epsilon = 80$), ya que se sabe que el uso de constantes dieléctricas bajas puede originar resultados erróneos (falsos mínimos) para compuestos tan polares como los carbohidratos³⁸. Sin embargo, este tratamiento dieléctrico puede ser una aproximación bastante tosca para moléculas con tal elevada densidad de carga negativa como la que presentan los compuestos 1 – 4.

Como se ha visto, el estudio de los NOEs exclusivos nos ha permitido acotar la región (Φ, Ψ) que es compatible con ellos, pero, no obstante, las regiones (Φ, Ψ) denominadas *syn- Ψ* presentan cierta indeterminación, lo que dificulta el establecimiento de cuál es el mínimo exacto compatible con los datos de RMN. Así, por ejemplo, la región *syn- Ψ* correspondiente a las uniones GlcN-IdoA presenta dos mínimos cuando el anillo de L-IdoA se encuentra en conformación de silla 1C_4 . En la **figura 3.3.3** se ilustra esto mediante la representación de la superficie de energía potencial de las uniones GlcNS,6S-IdoA·2S que se encuentran en 1, tomada como ejemplo general de las superficies de las uniones GlcN-IdoA, ya que se ha visto que todas presentan básicamente la misma topología.

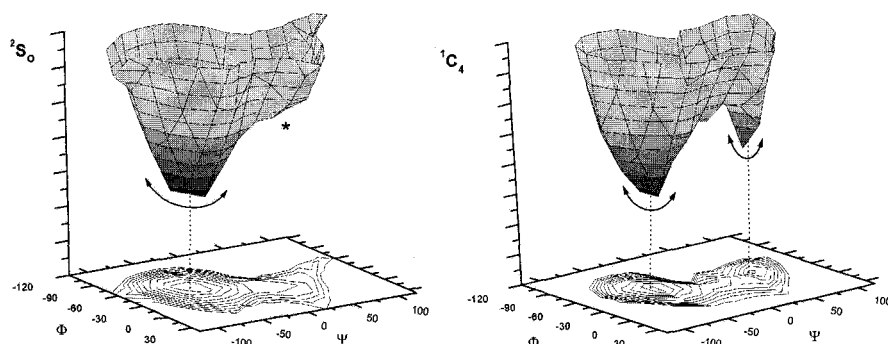


Figura 3.3.3 Ampliación de la superficie 3D de energía potencial de la región *syn- Ψ* de la unión glicosídica GlcNS,6S-IdoA·2S.

Por otro lado, para las uniones IdoA-GlcN, el pozo de energía correspondiente a la región *syn*- Ψ es bastante ancho a lo largo de la coordenada Ψ ($-60^\circ \leq \Psi \leq +60^\circ$) cuando el anillo de L-IdoA está como silla 1C_4 , pudiendo presentar múltiples mínimos locales (figura 3.3.4).

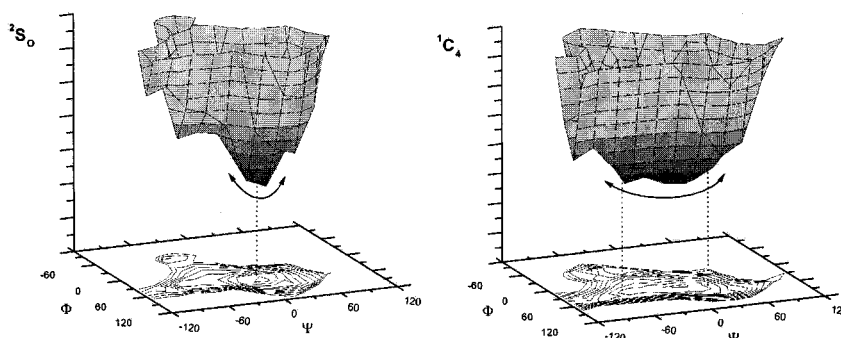


Figura 3.3.4 Ampliación de la superficie 3D de energía potencial de la región *syn*- Ψ de la unión glicosídica IdoA-2S-GlcNS,6S.

Para poder resolver estas indeterminaciones y tratar de definir mejor la región "más compatible con los datos experimentales" tenemos que recurrir a aquellos NOEs interresiduales que, aún no siendo exclusivos de ningún mínimo, nos ofrecen gran cantidad de información.

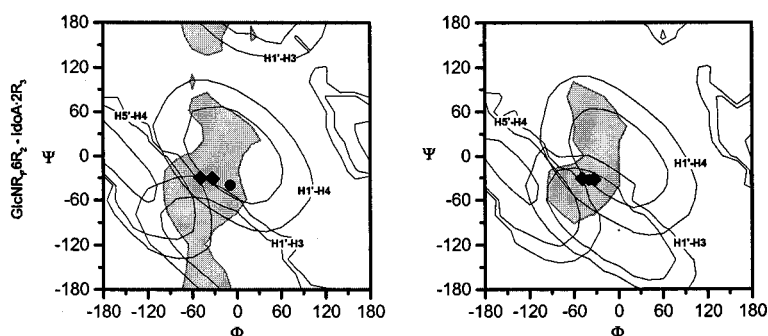


Figura 3.3.5 Curvas de nivel correspondientes a distancias de los NOEs H1'-H4, H1'-H3, y H5'-H4, para una unión genérica GlcN-IdoA. (♦) hexasacárido de Mikhailov et al. (●) heparina natural (Mulloy et al.).

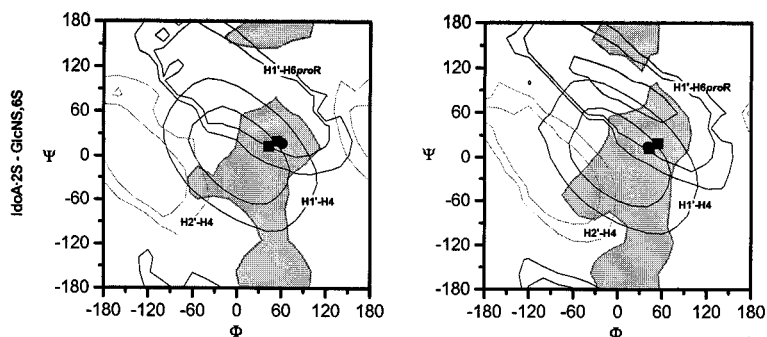


Figura 3.3.5 Curvas de nivel correspondientes a distancias de los NOEs $H1'-H4$, $H1'-H6proR$, y $H2'-H4$ (gris, se observa débilmente), para una unión genérica $IdoA-GlcN$. (♦) hexasacárido de Mikhailov et al. (●) heparina natural (Mulloy et al.).

Estos NOEs se representan en las figuras 3.3.5 y 3.3.6, junto con el NOE $H1'-H4$. De nuevo se han tomado las uniones de 1 como referencia.

Además, se han representado los valores (Φ, Ψ) correspondientes a las estructuras publicadas de la heparina natural y de un hexasacárido derivado por despolimerización enzimática de ésta.

Para las uniones $GlcN-IdoA$, la observación de los NOEs intensos $H1'-H4$ y $H1'-H3$, así como el NOE $H5'-H4$ en aquellos casos en los que el solapamiento lo permite (2, 4, y la unión f-e de 3), nos indica que el mínimo situado en la región $syn-\Psi$ de valores $\Phi < 0$, $\Psi < 0$ debe estar mayoritariamente poblado. De otra forma, deberíamos observar una intensidad fuerte para el NOE $H1'-H4$ y relativamente débil, o intensidad media, para el NOE $H1'-H3$. No obstante se debe tener precaución en los razonamientos por comparación de intensidades de estos NOEs ya que la anisotropía de la reorientación molecular que se discutió en el apartado anterior puede afectar a éstas. De forma interesante, en dicha región se localizan los datos correspondientes a los productos naturales, que se recogen en la bibliografía. El dato que más se separa del mínimo predicho por el mapa (figura 3.3.5) es el que corresponde al modelo de heparina natural con el anillo de L- $IdoA$ en 2S_0 . En este caso hay que tener en cuenta dos aspectos importantes: los datos de heparina natural se recogieron a $70^\circ C$, y con un producto (heparina

de pulmón de vaca) con una heterogeneidad elevada en comparación con el hexasacárido estudiado por Mikhailov et al., y, por supuesto, con respecto a nuestros productos sintéticos. En este sentido, resulta importante resaltar el acuerdo existente entre los datos de Mikhailov et al. y nuestros modelos.

En el caso de las uniones IdoA-GlcN, la observación de los NOEs intensos H1'-H4 y H1'-H6_{proR} para todos los hexasacáridos, apunta a que el mínimo localizado en la región *syn-Ψ* de valores $\Phi > 0$, $\Psi > 0$ debe estar mayoritariamente poblado. Además, en este caso, los datos de la bibliografía prácticamente coinciden con el mínimo localizado en dicha región. Finalmente, es interesante resaltar que la predicción de un mínimo “no exoanomérico” (en el entorno de (-60°, -60°)) para estas uniones (**figura 3.3.5**) se corrobora experimentalmente por la observación del NOE H2'-H4, que, como se puede ver en la **figura 3.3.5**, es característico de dicho mínimo. Este NOE no se recoge en la **tabla 2.3.7** (capítulo 2) debido a que su intensidad es muy débil, indicando que dicho mínimo debe contribuir en una población muy pequeña, pero observable por RMN. Dicho NOE no se puede observar en algunos casos donde el solapamiento lo impide (p.ej. **3**, y la unión **c-b** de **2**).

Toda la discusión expuesta anteriormente nos lleva a que:

- Para todas las uniones GlcN-IdoA, el mínimo que predicen los mapas en el entorno de (-50°, -40°) es el que presenta un mejor acuerdo con los datos de NOEs interresiduales. Además, dicho mínimo coincide razonablemente bien con los datos de la heparina natural [(-39°, -33°) para ¹C₄, y (-9°, 41°) para ²S_O]. El acuerdo es mucho mejor en el caso del hexasacárido estudiado por Mikhailov et al. [(-49°, -31°), y (-33°, -32°)]. Las diferencias son justificables si se tienen en cuenta los diferentes campos de fuerza utilizados (MM2, Mulloy et al.; AMBER-Homans, Mikhailov et al.), así como las diferentes temperaturas para la obtención de los datos de RMN (70°C, Mulloy et al.; 5°C, Mikhailov et al.). En cualquier caso no estamos interesados en los datos

exactos de (Φ, Ψ) de los mínimos, sino en definir qué región de mínima energía es la que se ajusta mejor a los datos experimentales.

- Para todas las uniones IdoA-GlcN, el mínimo que predicen los mapas en el entorno de $(45^\circ, 15^\circ)$ es el que presenta un mejor acuerdo con los datos de NOEs interresiduales. De forma análoga, dicho mínimo se ajusta razonablemente bien a los datos recogidos para estas uniones glicosídicas en la heparina natural [$(41^\circ, 14^\circ)$ para 1C_4 , y $(61^\circ, 16^\circ)$ para 2S_0] y en el hexasacárido de Mikhailov et al. [$(43^\circ, 12^\circ)$, y $(54^\circ, 19^\circ)$].
- Dichos mínimos, tal y como concluyeron Mulloy et al. y Mikhailov et al., conducen, para todos los hexasacáridos, a una estructura global en forma de hélice a derechas, en la que los distintos sustituyentes en 2,6-GlcN y 2-IdoA se sitúan hacia caras opuestas de dicha hélice (**figura 3.3.6** y **figura 3.3.7**). Esta geometría global hace que, en el caso de la molécula **2**, los grupos sulfato estén dispuestos exclusivamente hacia una sola cara de dicha hélice.

Como se ha discutido, la precisión de los valores de (Φ, Ψ) obtenidos en los mapas relajados, como determinantes de la estructura global de los 4 hexasacáridos, es más bien limitada. En este sentido, nuestro interés se centró en el hecho de que los valores de las torsiones glicosídicas recogidas en la bibliografía para la heparina natural se corresponden con zonas energéticamente favorables y compatibles con los datos de RMN de las moléculas **1, 2, 3**, y **4**. Por ello, se estimó razonable tomar dichos valores de (Φ, Ψ) para la construcción de los modelos moleculares iniciales para las simulaciones de dinámica molecular, que se discuten en el apartado siguiente. En las **figuras 3.3.6** y **3.3.7** se recogen los 8 modelos construidos, teniendo en cuenta las 2 posibles conformaciones 1C_4 y 2S_0 del anillo de L-idurónico.

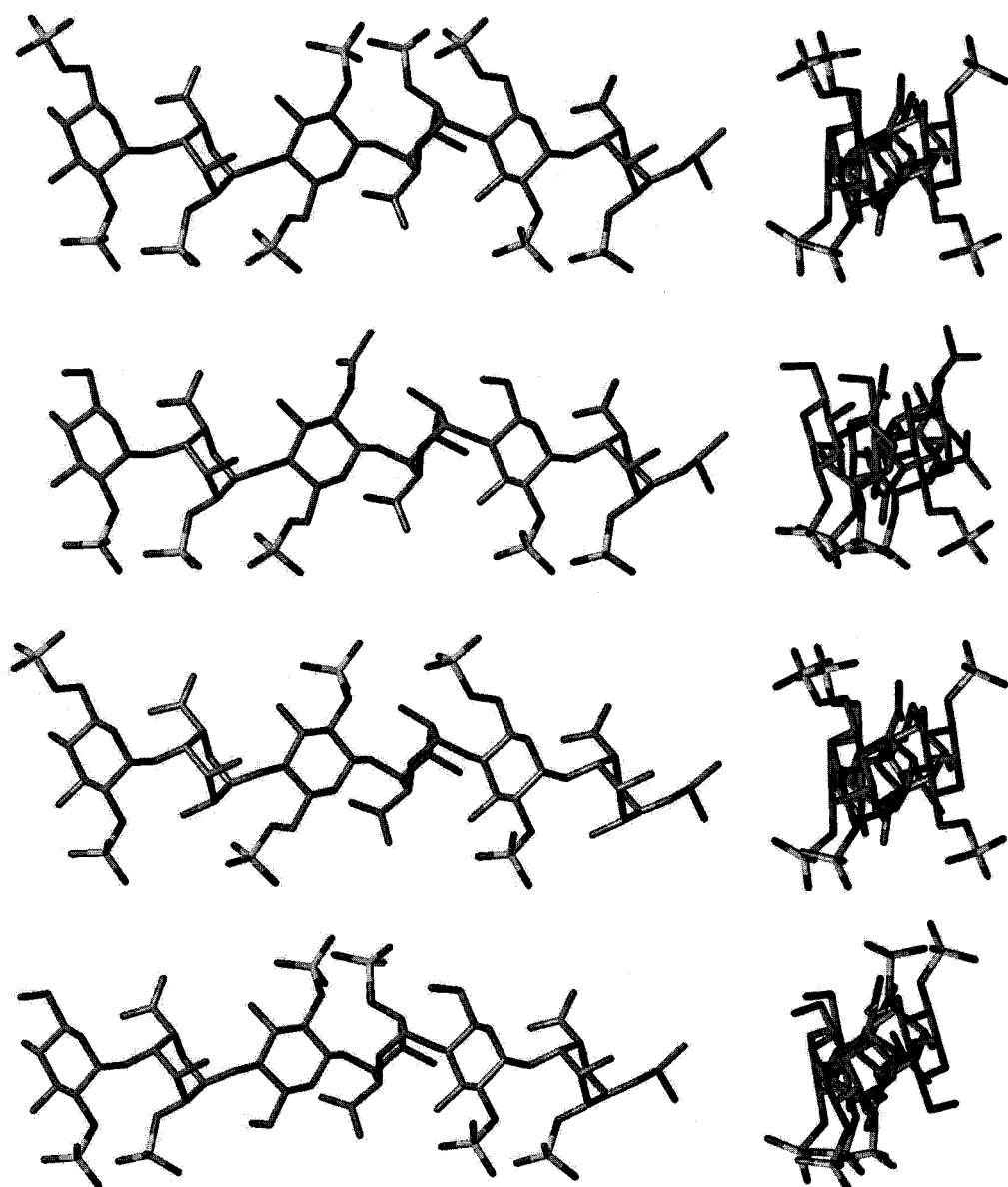


Figura 3.3.6 Vistas ortogonales de los modelos moleculares iniciales para las simulaciones de dinámica molecular de 1, 2, 3, y 4, (de imagen superior a imagen inferior, respectivamente), con todos los anillos de L-IdoA en conformación de silla 1C_4 . Para simplificar no se han representado los átomos de hidrógeno.

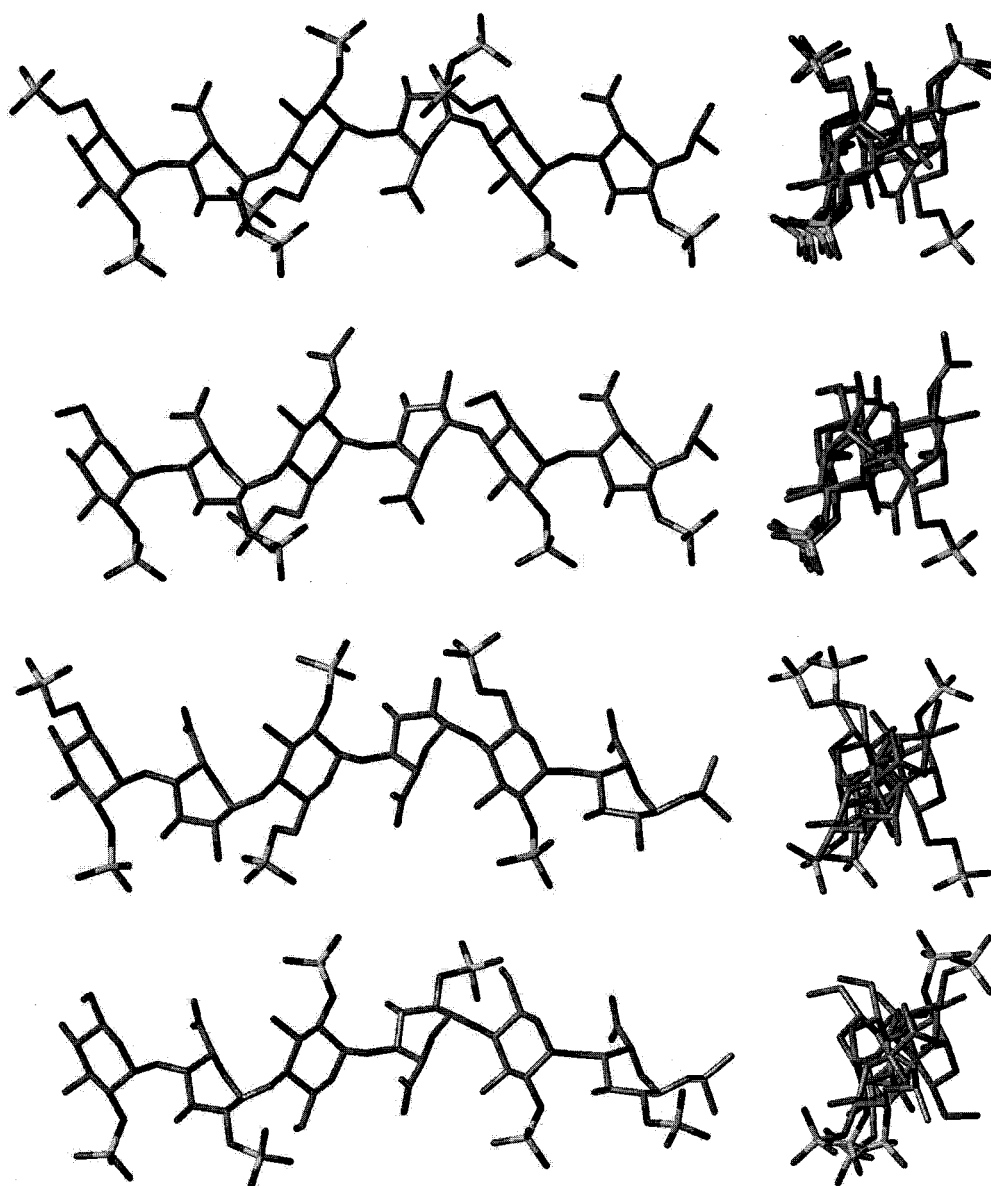


Figura 3.3.7 *Vistas ortogonales de los modelos moleculares iniciales para las simulaciones de dinámica molecular de 1,2,3, y 4, (de imagen superior a imagen inferior, respectivamente), con todos los anillos de L-IdoA en conformación de silla 2S_0 . Para simplificar no se han representado los átomos de hidrógeno*

3.3.2 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR

El estudio de las características conformacionales dinámicas de estas estructuras iniciales se puede llevar a cabo mediante la aplicación de la metodología de dinámica molecular. En un principio, nuestro interés se centró, lógicamente, en el estudio de la estabilidad dinámica de dichas estructuras, así como en la obtención de parámetros estructurales promediados a lo largo de las simulaciones que pudieran ser comparados con observables de RMN. Sin embargo, las características peculiares que presentan estas moléculas, como son la elevada densidad de carga negativa y, especialmente, el carácter policonformacional de los residuos de ácido L-idurónico, han conducido forzosamente a la realización de un estudio teórico inicial del efecto que las distintas aproximaciones comúnmente empleadas en simulaciones de dinámica molecular tienen sobre los resultados teóricos y su ajuste con los datos experimentales de RMN.

Así pues, este apartado se puede considerar formalmente dividido en dos subapartados. En el primero se lleva a cabo un estudio comparativo de las distintas aproximaciones empleadas en dinámica molecular para el modelado del disolvente, así como los distintos tipos de tratamientos para las interacciones electrostáticas de largo alcance. El énfasis se pone en el equilibrio conformacional del anillo de ácido L-idurónico. Por razones históricas, todos estos estudios se llevaron a cabo sobre el hexasacárido **1**, ya que fue la primera de estas 4 moléculas que se sintetizó en nuestro laboratorio. En la segunda parte de este apartado, las conclusiones obtenidas previamente son aplicadas al estudio comparativo de la dinámica molecular de los 4 hexasacáridos (1-4).

3.3.2.1 Simulaciones de dinámica molecular y la descripción de la flexibilidad del anillo de L-iduronato

Cualquier estudio teórico sobre las conformaciones de glicosaminoglicanos que contengan anillos de ácido L-idurónico debe ser capaz, evidentemente, de producir datos relativos a las conformaciones de dichos anillos que estén de

acuerdo con los resultados experimentales obtenidos por RMN. Esto, que puede parecer trivial, tiene que ser resaltado ya que la cuestión de las conformaciones accesibles a los anillos de ácido L-idurónico es un asunto hoy día todavía controvertido. Concretamente, como se comentó en la introducción a este capítulo, uno de los aspectos más discutibles es que la conformación de bote torcido 2S_0 sea la única accesible de todo el posible itinerario pseudorrotacional. Desde el punto de vista energético, para las conformaciones de silla cabe esperar que pequeñas fluctuaciones en los ángulos diedros $C_i-C_{i+1}-C_{i+2}-C_{i+3}$ endocíclicos, como consecuencia de la dinámica interna, no modifiquen sustancialmente dicha conformación, pero las transiciones entre los distintos botes/botes-torcidos presentes en el itinerario pseudorrotacional implican barreras energéticas más pequeñas en comparación con los cambios entre cualquiera de los 2 polos de la esfera de plegamiento (sillas) y el ecuador (botes / botes torcidos), y viceversa^{39,40}.

Ya hemos visto que los resultados de dinámicas moleculares que se recogen en la bibliografía no han permitido esclarecer si dicha conformación de bote torcido 2S_0 es un mínimo bien definido en el espacio de fases de la dinámica molecular, o si, por el contrario, presenta característicamente un extenso equilibrio pseudorrotacional. Nosotros hemos abordado dicho problema sobre el modelo 1. Para ello, hemos analizado el comportamiento de sus anillos de ácido L-idurónico a lo largo de distintas simulaciones de dinámica molecular. Este estudio se puede considerar dividido en 4 aproximaciones, que, a su vez, representan distintas filosofías respecto a la consideración del disolvente para simulaciones de dinámica molecular. Se presentan en el orden en el que se fueron realizando, lo que finalmente ha llevado, a su vez, a una ordenación de complejidad computacional creciente.

Como ya se ha dicho en el capítulo anterior, los datos de RMN que se utilizan tradicionalmente para caracterizar el equilibrio conformacional de estos residuos son dos: la observación del NOE H2-H5 intra-anular, y las constantes de acoplamiento vecinales ${}^3J_{H,H}$. Por lo tanto, éstos son los parámetros

experimentales que, por comparación con las predicciones teóricas, nos permitirán establecer la “bondad” de las simulaciones de dinámica molecular.

▪ **1ª APROXIMACIÓN: Dinámica molecular *in vacuo* con $\epsilon = 80$.**

La aproximación más sencilla para considerar el efecto del disolvente en las simulaciones de dinámica molecular de biomoléculas es, obviamente, utilizar la constante dieléctrica macroscópica del agua ($\epsilon = 80$) en el término de Coulomb del campo de fuerzas.

Para la discusión nos centramos en la simulación de dinámica molecular del modelo 1 con todos los anillos de L-IdoA en conformación de 2S_0 .

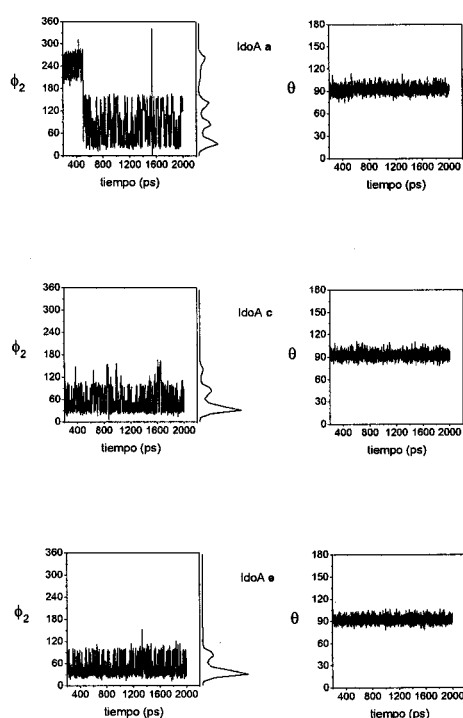


Figura 3.3.8 Evolución de las coordenadas de plegamiento ϕ_2 y θ para los residuos de L-iduronato de 1 (modelo 2S_0). (2ns MD “*in vacuo*” $\epsilon = 80$, 298 K). Para ϕ_2 se muestran las curvas de distribución.

En la **figura 3.3.8** se representan las gráficas de evolución temporal de la coordenada de plegamiento azimutal, ϕ_2 , para un valor de la coordenada polar, θ , de 90° (ecuador de la esfera), a lo largo de una simulación de 2 ns a 298 K.

El rasgo característico es, claramente, el extenso equilibrio pseudorrotacional que presentan los tres anillos de L-IdoA (se cubren las regiones correspondientes a 3S_1 , 5S_1 , 2S_0 , y 1S_5 para **a**) con una participación muy pequeña del bote torcido 2S_0 , especialmente para los residuos **c** y **e**, a pesar de que dicha conformación fue la establecida como estructura de partida. Estos resultados indican que, efectivamente, en estas condiciones de simulación, el conformero 2S_0 no es un mínimo bien definido en el itinerario pseudorrotacional, de nuevo en contra de los resultados de mecánica molecular en la bibliografía para el metilglicósido de idurónico³⁹.

La validez o no de estas simulaciones se estableció mediante la comparación con los datos experimentales (RMN). Nuestro criterio de validación se basó principalmente, al igual que se recoge en la bibliografía⁴¹, en la comparación de las constantes de acoplamiento promediadas a lo largo de la dinámica molecular, con los datos experimentales (**tabla 2.3.3**, capítulo 2).

Las constantes de acoplamiento vecinales $^3J_{H,H}$ promediadas a lo largo de la dinámica molecular se obtuvieron por aplicación de la ecuación tipo Karplus modificada por Haasnoot (**Ec. 2.1.2**, capítulo 2) a cada una de las estructuras recogidas en el fichero de trayectoria (4000). Los valores medios, $\langle ^3J_{H,H} \rangle$, así como las desviaciones estándar obtenidas de esta forma, se recogen en la **tabla 3.3.2.**, clasificados por la conformación inicial del anillo de L-IdoA.

Modelo inicial:	Residuo					
	a		c		e	
	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0
$J_{H,H}$						
H1-H2	1.8 ± 0.5	5.8 ± 2.0	1.8 ± 0.5	6.7 ± 1.0	1.8 ± 0.5	6.7 ± 0.9
H2-H3	2.5 ± 0.9	3.7 ± 3.5	2.7 ± 1.0	2.4 ± 2.7	2.7 ± 1.0	1.7 ± 2.0
H3-H4	2.6 ± 0.9	4.0 ± 2.4	2.7 ± 0.9	3.3 ± 1.6	2.8 ± 0.9	3.3 ± 1.5
H4-H5	1.4 ± 0.8	3.0 ± 2.2	1.5 ± 0.8	2.6 ± 1.7	1.5 ± 0.8	2.7 ± 1.7

Tabla 3.3.2 Acoplamientos vecinales H-H promediados a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular ($\epsilon = 80$)

Considerando que la escala de tiempo de la interconversión silla-bote torcido, del orden de milisegundos⁴², está muy por encima de las escalas de las simulaciones, y teniendo en cuenta que durante las simulaciones los anillos permanecen a lo largo del ecuador de la esfera de plegamiento (coordenada $\theta=90^\circ$), parece razonable tomar los valores promediados para las sillas 1C_4 y para dicho colectivo pseudorrotacional “ xS_y ”, recogidos en la **tabla 3.3.2**, como valores de referencia para un ajuste mediante mínimos cuadrados con los valores de ${}^3J_{H,H}$ experimentales. Esto nos permite obtener las poblaciones de conformeros para 1C_4 y el “colectivo xS_y ”. A su vez, mediante la integración de las curvas de distribución de la coordenada azimutal de plegamiento ϕ_2 , para cada una de las distintas regiones que definen un determinado conformero, dicho colectivo se puede separar en sus % de conformeros constituyentes. Estos resultados se muestra en la **tabla 3.3.3**

Residuo	Población de conformeros (%)					χ^2
	1C_4	1S_5	2S_0	5S_1	3S_1	
a	52	7	10	14	17	0.6
c	74			8	18	5.4
e	87			3	10	5.8

Tabla 3.3.3 Poblaciones de conformeros obtenidas mediante ajuste entre las constantes $\langle {}^3J_{H,H} \rangle$ promediadas a lo largo de las dinámicas moleculares y las experimentales.

La distribución de conformeros que se obtiene no es compatible con los datos experimentales de RMN. Esto se pone claramente de manifiesto si consideramos los casos de los residuos **c** y **e**. Para dichos residuos la contribución de la conformación de bote torcido 2S_0 es prácticamente nula (los valores de la **tabla 3.3.3** están redondeados a unidades enteras). Esto es incompatible con la observación experimental de los NOEs intraanulares H2-H5 de intensidades similares para los 3 residuos de **1**.

▪ **2ª APROXIMACIÓN: Dinámica molecular *in vacuo* con $\epsilon = 5r$.**

La consideración de una constante dieléctrica dependiente de la distancia [$\epsilon = \epsilon(r)$] es bastante común en simulaciones de dinámica molecular de sistemas en los que la energía de interacción electrostática puede ser importante, reduciendo así el elevado apantallamiento electrostático que puede producir el uso de $\epsilon = 80$, y evitando la sobreestimación del término de Coulomb para ϵ muy bajas, en cuyo caso pueden ejercer un efecto dominante los enlaces de hidrógeno intramoleculares. Es importante resaltar que, a pesar de su efectividad mimetizando el efecto de un disolvente polar como el agua, diversos autores aseguran que el uso de modelos dieléctricos dependientes de la distancia carece de base física alguna^{43,44}, como consecuencia de la introducción de una proporcionalidad artificial para el término del potencial electrostático, que pasa a decaer como r^{-2} , en lugar de r^{-1} .

La forma funcional de la constante dieléctrica en este tipo de simulaciones es $\epsilon = N \cdot r$, donde N es un número natural, y r la distancia. La determinación del número N , en nuestro caso se llevo a cabo por “ensayo-error”. Diversas variaciones de N pusieron claramente de manifiesto que tanto la extensión como los tipos de conformeros presentes en el equilibrio pseudorrotacional es fuertemente dependiente del tratamiento electrostático. A valores altos de N , se observa el equilibrio pseudorrotacional extenso que se tiene con $\epsilon = 80$. A valores muy bajos ($N = 1$), se reduce considerablemente la extensión de dicho equilibrio, pero los anillos presentan una fuerte tendencia a interconvertirse hacia la conformación de silla 4C_1 , no compatible con los datos experimentales (${}^3J_{H,H}$). Los mejores resultados, en términos de reducción del extenso equilibrio pseudorrotacional y de estabilización de la conformación de bote torcido 2S_0 se obtuvieron para $\epsilon = 5 \cdot r$, y son los que se recogen en este apartado.

De nuevo, a pesar de que las simulaciones se llevaron a cabo en todos los casos para los dos modelos límite (1C_4 y 2S_0), nuestro interés se centra en el análisis de los resultados del modelo 1 en el que todos los anillos de L-IdoA están inicialmente en conformación de 2S_0 . En la **figura 3.3.9** se representan nuevamente las gráficas de evolución temporal de la coordenada de plegamiento azimutal, ϕ_2 , para un valor de la coordenada polar, θ , de 90° (ecuador de la esfera), a lo largo de la simulación de 2 ns a 298 K.

Los resultados indican la existencia de un equilibrio pseudorrotacional, especialmente en el caso de los residuos a y e. Es interesante resaltar, no obstante, como al aumentar el “peso” de las interacciones electrostáticas, con respecto a la 1ª aproximación, la región del espacio pseudorrotacional accesible se ha disminuido, especialmente para el residuo central IdoA-e. Además, las curvas de distribución de ϕ_2 indican que los conformeros que participan en el equilibrio son distintos a los que aparecían de forma mayoritaria con $\epsilon = 80$. En este caso, las únicas conformaciones accesibles son los botes torcidos 2S_0 y 5S_1 .

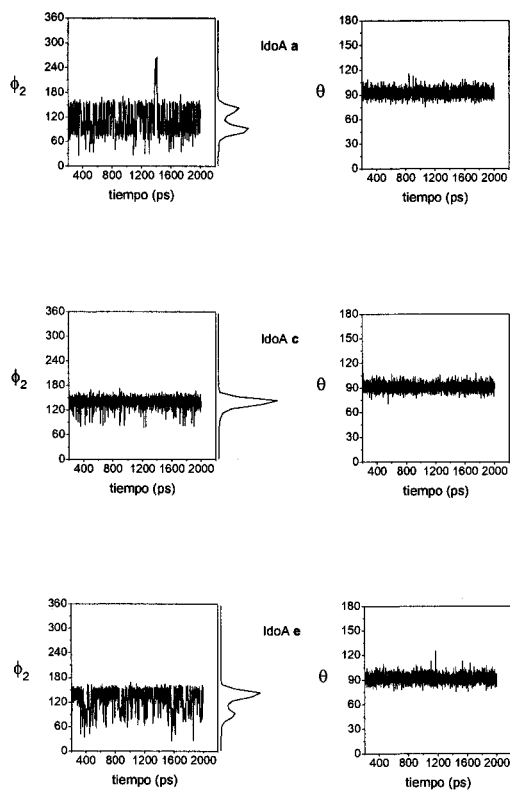


Figura 3.3.9 Evolución de las coordenadas de plegamiento ϕ_2 y θ para los residuos de L-iduronato de 1 (modelo 2S_0). (2ns MD “in vacuo” $\epsilon = 5 \cdot r$, 298 K). Para ϕ_2 se muestran las curvas de distribución.

Nuevamente se calcularon los valores de $^3J_{H,H}$ promediados a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular, $\langle ^3J_{H,H} \rangle$. Estos valores así como sus desviaciones standard, se recogen en la **tabla 3.3.4**.

Modelo inicial:	Residuo					
	a		c		e	
	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0
$J_{H,H}$						
H1-H2	1.9 ± 0.5	7.0 ± 1.3	1.9 ± 0.5	6.3 ± 1.0	1.9 ± 0.5	6.7 ± 1.1
H2-H3	2.7 ± 1.0	6.9 ± 2.6	2.7 ± 0.9	9.5 ± 1.1	2.7 ± 0.9	8.3 ± 2.2
H3-H4	2.8 ± 1.0	2.6 ± 2.3	2.8 ± 0.9	4.7 ± 1.9	2.9 ± 0.9	3.6 ± 2.3
H4-H5	1.3 ± 0.8	1.7 ± 1.7	1.4 ± 0.8	3.2 ± 1.4	1.3 ± 0.8	2.4 ± 1.7

Tabla 3.3.4 Acoplamientos vecinales H-H promediados a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular ($\epsilon = 5 \cdot r$)

Los porcentajes de conformeros que dan el mejor ajuste por mínimos cuadrados entre los datos promediados teóricos (tabla 3.3.4) y los experimentales (tabla 2.3.3; capítulo 2) se recogen en la tabla 3.3.5.

Residuo	Población de conformeros (%)					χ^2
	1C_4	1S_5	2S_0	5S_1	3S_1	
a	69		12	19		2.6
c	61		39			0.5
e	60		28	12		1.5

Tabla 3.3.5 Poblaciones de conformeros obtenidas mediante ajuste entre las constantes $\langle {}^3J_{H,H} \rangle$ promediadas a lo largo de las dinámicas moleculares y las experimentales.

Los resultados son parcialmente satisfactorios. La distribución de conformeros del itinerario pseudorrotacional se ha reducido de forma que la conformación de bote torcido 2S_0 contribuye en un porcentaje que, en principio, es compatible con la observación del NOE intrarresidual H2-H5 para los 3 residuos presentes en **1**. No obstante, las poblaciones son dependientes de la posición del residuo en la cadena.

Desde el punto de vista teórico de modelización molecular, las curvas de distribución de la coordenada azimutal ϕ_2 (figura 3.3.9) nos dan una información valiosa sobre el principal defecto presentan estas simulaciones, que es el efecto de la asimetría en el potencial electrostático, que se produce al aumentar el peso de la energía electrostática en el campo de fuerzas. El reflejo de este efecto es que el equilibrio pseudorrotacional claramente se amplía cuando nos acercamos hacia los extremos moleculares. Esto se deduce de la distribución de porcentajes de confórmeros: para el extremo reductor (38% 2S_0 : 62% 5S_1 , del 100% del itinerario ϕ_2); para el residuo central (100% 2S_0); y para el residuo más próximo al extremo no-reductor (69% 2S_0 : 31% 5S_1). Es decir, el anillo que está más próximo a uno de los extremos moleculares (IdoA-a) es el que presenta el menor porcentaje de conformación 2S_0 , mientras que el que muestra una mayor estabilización de dicha forma es el iduronato central (IdoA-c). El anillo de IdoA-e que se localiza en una situación intermedia, empieza a tener una mayor estabilización de la conformación 2S_0 .

Por lo tanto, la electrostática del sistema influye de forma importante en las conformaciones del bote torcido. En la figura 3.3.10 se ha tratado de representar un esquema bidimensional de cómo afectan de forma diferente los potenciales de interacción electrostática a los distintos anillos de ácido L-idurónico de 1.

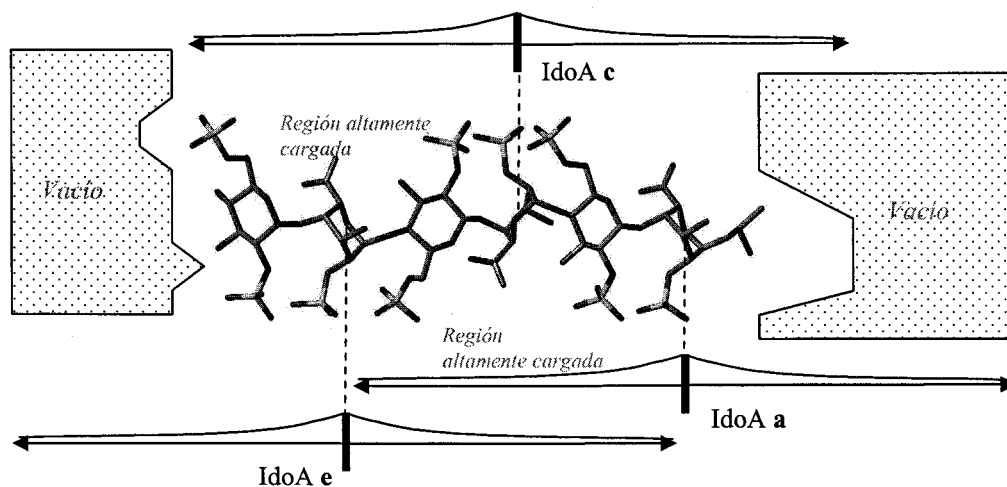


Figura 3.3.9 Asimetría en los potenciales de interacción electrostática (ver discusión en el texto), para la molécula 1, con $\epsilon = 5 \cdot r$.

En esta figura se representa esquemáticamente (las curvas no son matemáticamente exactas) cómo varía el potencial electrostático centrándonos en cada uno de los anillos de idurónico, a lo largo de la dimensión del eje principal de inercia molecular. Lo importante es tener en cuenta que las regiones del espacio que ejercen una influencia electrostática sobre el residuo central IdoA-c están ocupadas principalmente por los residuos restantes de la molécula, que son adyacentes a él, independientemente de las rotaciones y/o traslaciones moleculares. Sin embargo, a medida que nos acercamos hacia los extremos de la molécula, las regiones que ejercen dicha influencia son claramente asimétricas. Para el IdoA-a, la situación es la más extrema, ya que por un lado (región izquierda, en la **figura 3.3.9**) sufre la interacción con el sistema de cargas parciales que constituyen los residuos adyacentes, mientras que por el otro lado (región derecha), no experimenta interacción con ninguna carga explícita. Lo interesante es que, precisamente, el anillo central es el que presenta una mayor estabilización del bote torcido 2S_0 , lo que nos indica que dicha asimetría en los potenciales de interacción electrostática está afectando a la estabilidad de los anillos en bote torcido, a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular.

El efecto de este tipo de asimetría no se hace patente en simulaciones de dinámica molecular con residuos en conformación de silla, debido a la mayor estabilidad mecánica de éstas, que hace que las variaciones en la energía electrostática no tengan un efecto considerable sobre ellos. Sin embargo, las simulaciones presentadas en este apartado demuestran que las interacciones electrostáticas ejercen una clara influencia sobre las barreras y los niveles de energía del itinerario pseudorrotacional para anillos flexibles como los de ácido L-idurónico, en sistemas moleculares tan cargados negativamente como los glicosaminoglicanos tipo heparina y/o sulfato de heparano.

El efecto de las fronteras “molécula-vacío” de un sistema en una simulación *in vacuo* se recoge en la bibliografía, y se ha mostrado ser especialmente importante para moléculas no-esféricas, como 1-4, debido a una tendencia a minimizar el área superficial molecular^{43,44}. No obstante, debido a su bajo coste

computacional, este tipo de simulaciones (*in vacuo*) se han empleado ampliamente en estudios conformacionales de oligosacáridos.

▪ **3ª APROXIMACIÓN: Dinámica molecular con disolvente explícito y aplicación de condiciones de frontera periódicas.**

El procedimiento para eliminar las asimetrías que se producen en las interfases “soluto-vacío” consiste en la inclusión explícita de moléculas del disolvente en las simulaciones, de forma que solvaten adecuadamente a dicho soluto. En este caso las asimetrías se trasladan a las posibles interfases “disolvente-vacío”, que se resuelven mediante la aplicación de las condiciones de frontera periódicas.

Debido a que el tamaño de nuestro sistema (162 átomos) no es excesivamente grande, si lo comparamos con los casos de simulaciones de proteínas, se decidió llevar a cabo simulaciones con inclusión de explícita de disolvente en una caja rectangular completa, con aplicación de condiciones de frontera periódicas, descartando, de este modo, la utilización de métodos computacionalmente menos exigentes, como por ejemplo la simulación en “gota” de disolvente, o la simulación en octaedro truncado, más adecuado para solutos esféricos. En el proceso de inmersión del soluto en la caja se incorporaron 12 iones Na^+ , a fin de neutralizar el sistema. Las simulaciones se llevaron a cabo a 298 K, con una constante de acoplamiento al baño térmico de 0.2 ps, una constante dieléctrica de 1, y se aplicó una distancia de truncado para las interacciones de no-enlace de 9 Å.

Uno de los aspectos más importantes de las simulaciones con caja periódica de agua lo constituye la “equilibración” del sistema, ya que aunque nuestro soluto esté inicialmente minimizado, el proceso de construcción del sistema “soluto + contraiones + disolvente” implica la perturbación de cada uno de los tres componentes. Para nuestras simulaciones se hizo uso del protocolo de equilibración habitual (véase parte experimental), consistente en 1 o varias minimizaciones energéticas del sistema con restricciones posicionales en los

átomos del soluto, para eliminar los malos contactos iniciales entre las moléculas de disolvente y los contraiones, seguida de una dinámica a presión constante para equilibrar la densidad del sistema, disminuyendo el volumen inicial de la caja. Finalmente, tras la equilibración, se lleva a cabo la dinámica molecular “productiva” de la que, tras un período inicial que se descarta (varios cientos de picosegundos), podemos extraer la información. Esta última dinámica se puede realizar a presión constante (NTP), o a volumen constante (NTV). Esta última fue la aproximación seguida aquí, siguiendo la metodología empleada por Mikhailov et al.^{32b} para la simulación del hexasacárido de secuencia complementaria a 1.

Los resultados de estas simulaciones ponen de manifiesto, al igual que ocurre en las dinámicas de Mikhailov et al., que cuando se eliminan las restricciones posicionales sobre los átomos del soluto, la estructura global se hace tremendamente inestable. Los anillos de ácido L-idurónico presentan una fuerte tendencia hacia la conformación de silla 4C_1 , tras un equilibrio pseudorrotacional que puede implicar botes torcidos distintos del 2S_0 (1S_3 , 1S_5). Además, el sistema se desestabiliza de tal forma que se observan conformaciones anómalas de bote o bote torcido para los residuos de D-glucosamina, totalmente incompatibles con los datos de constantes de acoplamiento que indican que dichos residuos están en una conformación estable de silla 4C_1 .

Evidentemente, no se pudo llevar a cabo un análisis comparativo de las constantes de acoplamiento experimentales con aquellas promediadas en el tiempo, tal y como se hizo en las dos aproximaciones anteriores.

En el caso del trabajo de Mikhailov et al., ellos postularon que dichas distorsiones de la geometría molecular se debían a sobreestimaciones de las contribuciones de las interacciones electrostáticas en la energía potencial total del sistema, lo que hace que estas dinámicas sean tremendamente sensibles a las posiciones iniciales de los contraiones, así como a las conformaciones iniciales del soluto. Para reducir al máximo el efecto de las posiciones de partida de los

contraiones, nosotros llevamos a cabo las simulaciones colocando los contraiones, durante la construcción de la caja, según el potencial electrostático molecular, en primera instancia, pero en una etapa posterior se alejaron manualmente en dirección perpendicular al eje principal de inercia molecular hasta una distancia que razonablemente permitiera la solvatación de los iones sin la interferencia del soluto ($r > 6 \text{ \AA}$). Además, las conformaciones iniciales del soluto provienen de una minimización en vacío previa, por lo que la geometría inicial debería estar suficientemente relajada.

Tomando como referencia la literatura existente sobre simulaciones de dinámica molecular de ácidos nucleicos^{45,46,47} con la inclusión explícita de disolvente, biomoléculas que también constituyen sistemas altamente cargados, nos inclinamos a suponer que el problema de la inestabilización del sistema podría radicar en la acumulación de errores en el cálculo de las interacciones electrostáticas de largo alcance que se produce como consecuencia de la aplicación de una distancia de truncado (“cutoff”) para dichas interacciones. La posibilidad de reducir estos efectos mediante un aumento de la distancia de truncado se ha señalado que no siempre es efectiva, ya que, como Schreider y Steinhauser⁴⁸ demostraron para el caso de una α -hélice peptídica, estos efectos del truncado no son monotónicamente dependientes de la distancia de corte, por lo que no está asegurado que se vayan a obtener mejores resultados exclusivamente incrementando ésta.

- **4ª APROXIMACIÓN: Dinámica molecular con disolvente explícito, aplicación de condiciones de frontera periódicas y un tratamiento basado en “sumas de Ewald” para las interacciones electrostáticas de largo alcance**

La gran dificultad de obtener trayectorias estables en simulaciones de dinámica molecular de ADN y ARN con disolvente explícito y la introducción de una distancia de truncado, se pudo resolver con la aplicación del método de Ewald “partícula-malla” (PME; Particle Mesh Ewald)^{49,50,51}. La similitud de las

propiedades electrostáticas de estas biomoléculas con nuestros modelos hexasacarídicos, nos impulsó a probar la metodología PME para el tratamiento de las interacciones electrostáticas de largo alcance, como posible solución a los problemas de desestabilización molecular observados en las simulaciones totalmente solvatadas. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se aplica dicha metodología para modelos de heparina.

Para la equilibración del sistema, tomamos como referencia los protocolos que se recogen en la bibliografía para ácidos nucleicos y proteínas^{45,47,52,53}, que son generalmente más largos que en el caso de dinámicas con inclusión de un cutoff (véase parte experimental). Tras la equilibración, la dinámica “productiva” (2 ns) se llevó a cabo en el colectivo NTP ($P = cte$), a una temperatura de 300 K. Para el análisis de dichas dinámicas se descartaron los 200 ps iniciales.

El análisis de las coordenadas de plegamiento para los residuos de D-GlcN indicó que bajo estas condiciones de simulación los anillos permanecen estables, con ligeras fluctuaciones, en su conformación de silla 4C_1 a lo largo de todo el tiempo de simulación. Para los residuos de L-IdoA, los datos de plegamiento se muestran en la **figura 3.3.10**, para el modelo 2S_0 .

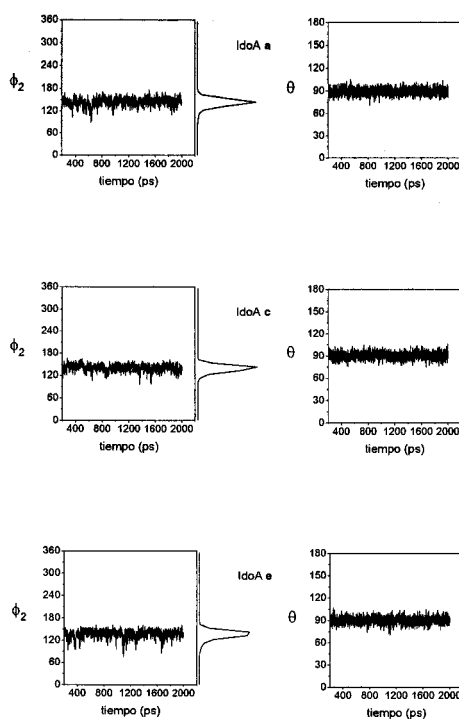


Figura 3.3.10 Evolución de las coordenadas de plegamiento ϕ_2 y θ para los residuos de L-iduronato de 1 (modelo 2S_0). (2ns MD-PME con H_2O -TIP3P, $\epsilon = 1$, 300 K). Para ϕ_2 se muestran las curvas de distribución.

Interesantemente, bajo estas condiciones de simulación, no sólo la estructura molecular es estable, como lo demuestra el hecho de que no existan distorsiones en los anillos de D-GlcN, sino que, además, para los 3 residuos de L-IdoA, el conformero 2S_0 es el conformero más poblado, con oscilaciones dentro de un pozo situado entre las conformaciones 2S_0 y ${}^{2,5}B$, pero en ninguno de los tres casos existe una contribución de ningún otro bote torcido. Las curvas de distribución muestran un máximo absoluto para $\phi_2 = 150^\circ$ (2S_0).

Estos datos son totalmente compatibles con la observación experimental del NOE H2-H5 para los tres residuos, de intensidades similares. Es importante resaltar que estos resultados se han obtenido sin la inclusión de ninguna restricción experimental que fuerce al sistema. Por otro lado, esto confirma que

el equilibrio pseudorrotacional extenso observado para los residuos próximos a los extremos en las simulaciones con $\epsilon = 5 \cdot r$ es un artefacto de la simulación como consecuencia de la asimetría en el potencial de interacción de no-enlace en la interfase “soluto-vacío”, así como que la desestabilización del sistema en las dinámicas con cutoff se deben a los errores asociados al truncado de las interacciones electrostáticas.

Considerando estos resultados, se puede postular que probablemente, las transiciones hacia conformaciones “alternativas” de los residuos de L-IdoA en el trabajo de Mikhailov et al., así como las distorsiones de los anillos de D-GlcN, se deban a una mala consideración las interacciones electrostáticas de largo alcance, más que a una especial sensibilidad a las condiciones iniciales. Respecto a las simulaciones de Mulloy et al., la comparación no es directa, debido a que ellos simulan un sistema menos cargado, como es un anillo de L-IdoA sin sulfatar, como monosacárido, o como residuo central de un trisacárido que contiene dos anillos de D-GlcNAc, también sin sulfatar. En ambos casos, la carga total fue de -1 solamente (la carga formal del carboxilato). No obstante, a la luz de estos resultados, sería interesante analizar si dicho equilibrio pseudorrotacional se mantiene en simulaciones con tratamiento PME.

Otro aspecto interesante que resulta de estas simulaciones viene del análisis de las coordenadas de plegamiento de los anillos de L-IdoA, para la simulación con el modelo inicial que presenta todos los idurónicos en conformación de silla 1C_4 (figura 3.3.11).

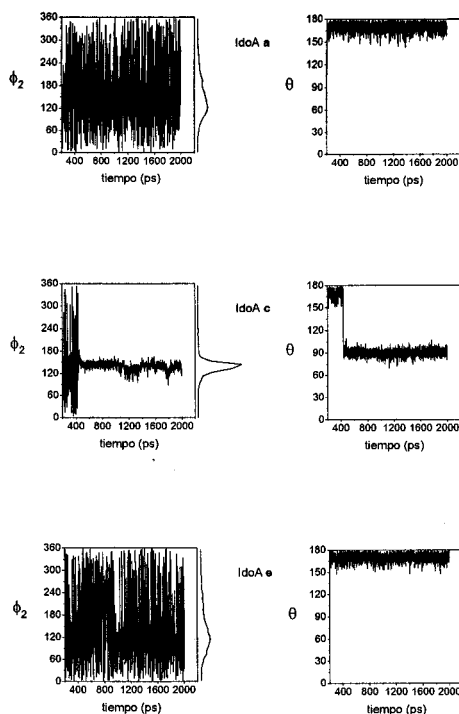


Figura 3.3.11 Evolución de las coordenadas de plegamiento ϕ_2 y θ para los residuos de L-iduronato de 1 (modelo 1C_4). (2ns MD-PME con H_2O -TIP3P, $\epsilon = 1$, 300 K). Para ϕ_2 se muestran las curvas de distribución

Como se observa en dicha figura, los anillos a y e permanecen en su conformación de silla 1C_4 a lo largo de toda la simulación, como lo demuestran los valores de sus coordenadas polares ($\theta \sim 180^\circ$). Para estos casos, la coordenada azimutal ϕ_2 presenta fuertes oscilaciones entre 0° y 360° , como consecuencia de que en los polos de la esfera dicha coordenada está indefinida (no hay “este” ni “oeste”). Sin embargo, para el anillo c, la coordenada θ sufre un cambio brusco de valor en el entorno de los 400 ps, indicando una transición conformacional desde el polo sur de la esfera de plegamiento ($\theta = 180^\circ$; silla 1C_4) hasta el ecuador ($\theta = 90^\circ$; itinerario pseudorrotacional). El análisis de los valores que toma la coordenada azimutal, indica claramente que la conformación a la que se llega mediante esta transición es la de bote torcido 2S_0 . Esta es la primera vez

que se ha podido observar una transición espontánea (sin la inclusión de ninguna restricción experimental) desde una conformación de silla 1C_4 hasta una de bote torcido 2S_0 para un residuo de ácido idurónico (sí se han descrito transiciones de bote/bote torcido a silla^{36,32b}, pero no en sentido contrario). Transiciones conformacionales de este tipo indican que no se produce una sobreestabilización de la estructura de partida como consecuencia de la aplicación de una verdadera periodicidad, como algunos autores afirman que puede ocurrir en simulaciones PME^{54,55}. En la bibliografía se recogen también datos de transiciones conformacionales para ácidos nucleicos en simulaciones de este tipo compatibles con los datos experimentales, lo que indica que dicha sobreestimación no es un factor importante a tener en cuenta, al menos para este tipo de biomoléculas⁴⁷.

En resumen, las simulaciones de dinámica molecular con la inclusión de disolvente explícito, condiciones de frontera periódicas, y la consideración completa de las interacciones electrostáticas de largo alcance a través del uso de la metodología de Ewald *partícula-malla* (PME) origina trayectorias estables de nuestro modelo de heparina natural, 1, indicando que la conformación de bote torcido 2S_0 es un mínimo bien definido en el espacio de fases, no observándose un equilibrio pseudorrotacional entre distintas conformaciones de bote torcido. Estas simulaciones son, a su vez, capaces de predecir transiciones conformacionales “silla \rightarrow bote torcido”, sin la inclusión de restricciones experimentales.

Respecto a esto último, hay que tener en cuenta que la escala de tiempo de las simulaciones es considerablemente inferior al tiempo característico del equilibrio conformacional ${}^1C_4 \leftrightarrow {}^2S_0$, del orden de milisegundos⁴²; por lo que no hemos podido observar una serie de transiciones, es decir, al nivel computacional disponible, no somos capaces de equilibrar dichas transiciones en una simulación de dinámica molecular. Precisamente este razonamiento es el que nos permite llevar a cabo el ajuste de las constantes de acoplamiento vecinales experimentales con las promediadas en la simulación, considerando los

colectivos $\langle {}^1C_4 \rangle$ y $\langle {}^2S_0 \rangle$ como “confórmeros” independientes, para cada uno de los cuales se puede establecer una fracción molar o “población”.

Para la comparación con los datos experimentales, de nuevo recurrimos a las constantes de acoplamiento promediadas en el tiempo de simulación, que se muestran en la **tabla 3.3.6**. Para el residuo **c**, en la simulación 1C_4 , sólo se consideraron los 400 ps iniciales en los que dicho anillo permaneció en dicha conformación. Esto no supone ningún error adicional importante, ya que las variaciones de las constantes de acoplamiento para los anillos de idurónico en 1C_4 , a lo largo de las simulaciones son relativamente pequeñas, en comparación con las variaciones para las conformaciones 2S_0 (**figura 3.3.12**)

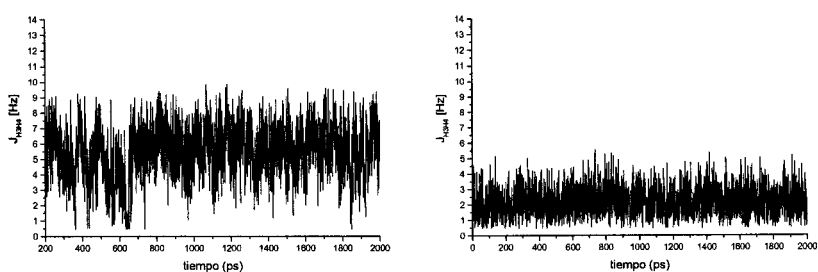


Figura 3.3.12 Historias de las constantes de acoplamiento ${}^3J_{H3,H4}$ del anillo *L-IdoA-a* de 1 a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular PME. Las estructuras de partida fueron: a) 2S_0 ; b) 1C_4 . Se puede observar la mayor variación en ${}^3J_{H3,H4}$ para el caso a). Se representa ${}^3J_{H3,H4}$ como ejemplo, ya que es la que más varía.

Modelo inicial:	Residuo					
	a		c		e	
	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0
$J_{H,H}$						
H1-H2	1.9 ± 0.6	6.5 ± 1.0	1.7 ± 0.5	6.4 ± 0.9	1.9 ± 0.5	6.5 ± 0.9
H2-H3	2.4 ± 1.0	10.0 ± 0.6	2.3 ± 1.0	9.8 ± 0.7	2.6 ± 0.9	9.7 ± 0.9
H3-H4	2.1 ± 0.9	5.6 ± 1.7	2.0 ± 0.8	5.2 ± 1.6	2.4 ± 0.9	4.7 ± 1.8
H4-H5	1.6 ± 0.9	3.8 ± 1.4	1.6 ± 0.8	3.2 ± 1.3	1.5 ± 0.8	2.9 ± 1.3

Tabla 3.3.6 Acoplamientos vecinales H-H promediados a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular PME.

Los resultados del ajuste mediante mínimos cuadrados entre dichos valores y los acoplamientos vecinales experimentales se recogen en la **tabla 3.3.7**

Residuo	Población de conformeros (%)					χ^2
	1C_4	1S_5	2S_0	5S_1	3S_1	
a	63		37			0.3
c	58		42			0.6
e	62		38			0.8

Tabla 3.3.7 Poblaciones de conformeros obtenidas mediante ajuste entre las constantes $\langle {}^3J_{H,H} \rangle$ promediadas a lo largo de las dinámicas moleculares y las experimentales.

Las poblaciones obtenidas a partir de las simulaciones de dinámica molecular concuerdan razonablemente bien con las obtenidas por ajuste matemático entre las constantes de acoplamiento experimentales y las teóricas para conformaciones canónicas de 1C_4 y 2S_0 (**tabla 2.3.5**; capítulo 2), aunque en este caso tenemos un ligero incremento de la población de 2S_0 . Cúal de las dos aproximaciones representa mejor el sistema real es difícil de dilucidar para el conjunto de datos del que disponemos, pero la ventaja de incluir el comportamiento dinámico de los anillos es indudable, de forma que obtenemos la

imagen de un bote torcido dinámicamente estable pero con una componente importante de flexibilidad.

Además, la comparación de los errores (χ^2) producidos para el ajuste a conformaciones canónicas (tabla 2.3.5; capítulo 2), por un lado, y por otro el ajuste a los colectivos $\langle {}^1C_4 \rangle$ y $\langle {}^2S_0 \rangle$ obtenidos mediante dinámicas moleculares PME (tabla 3.3.7) muestra que estos errores son considerablemente inferiores para el ajuste a los valores promediados en las simulaciones PME. Es decir, el colectivo que se obtiene a partir de estas simulaciones representa mejor el conjunto de datos experimentales que la consideración de un equilibrio entre dos conformaciones canónicas estáticas, a pesar de que se trate de las mismas conformaciones, o sea 1C_4 y 2S_0 . No obstante, se debe tener precaución con la interpretación de los errores, ya que se pueden dar casos de compensación de errores, como lo demuestra el hecho de que en las simulaciones con $\epsilon = 80$ (aproximación 1, en este capítulo), para el anillo a (tabla 3.3.3) se obtenga un error considerablemente inferior al que se obtiene por el ajuste a conformaciones canónicas, cuando se ha demostrado que dichas simulaciones no reproducen los datos experimentales de NOE. En aquel caso, el error se disminuye mucho porque la población de dicho residuo se “disemina” entre 4 conformaciones de botes torcidos, lo cual aumenta la posibilidad de encontrar combinaciones de sus ${}^3J_{H,H}$ teóricas que se ajusten lo mejor posible a las experimentales, originando una distribución “virtual” de conformeros.

Las trayectorias de las torsiones glicosídicas Φ y Ψ para los 5 enlaces glicosídicos de **1**, se muestran en la figura 3.3.11.

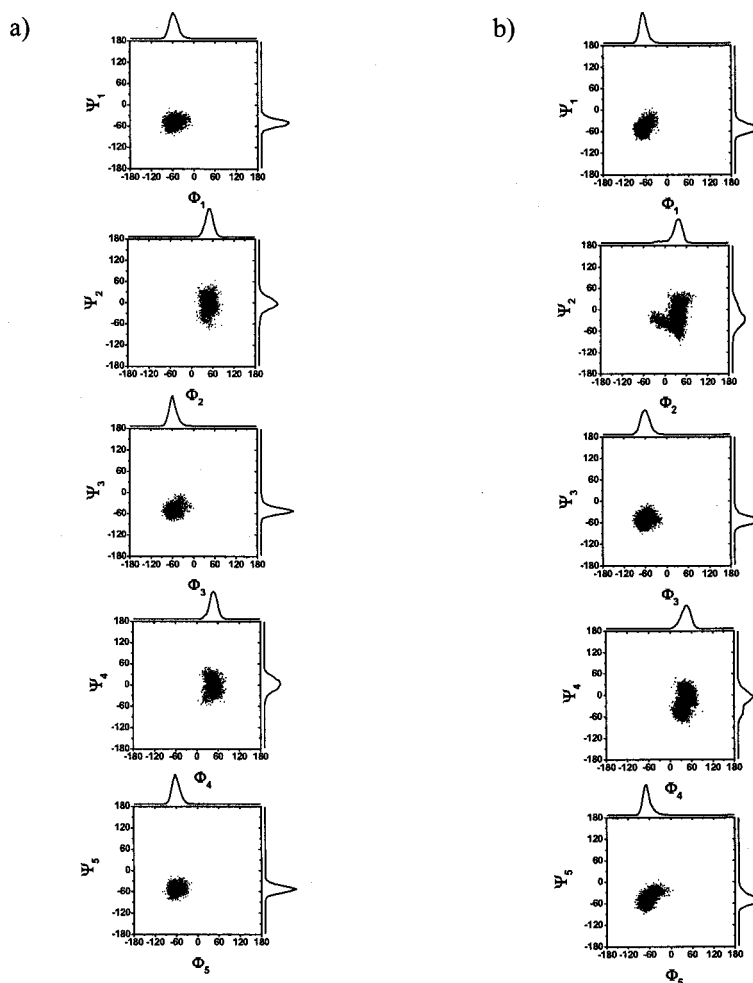


Figura 3.3.11 Trayectorias de las torsiones Φ y Ψ para los 5 enlaces glicosídicos de **1**. La numeración sigue el sentido “no-reductor” \rightarrow “reductor” ($f \rightarrow a$). a) modelo 2S_0 ; b) modelo 1C_4 . (2ns MD-PME con H_2O -TIP3P, $\epsilon = 1$, 300 K)

Las regiones del espacio conformacional (Φ, Ψ) que barren las 10 torsiones glicosídicas están de acuerdo con las predicciones de los mapas relajados de energía presentados con anterioridad (figuras 3.3.1 y 3.3.2). En todos los casos, las torsiones toman valores correspondientes a una geometría *syn- Ψ* , no observándose ninguna transición hacia alguna región *anti- Ψ* .

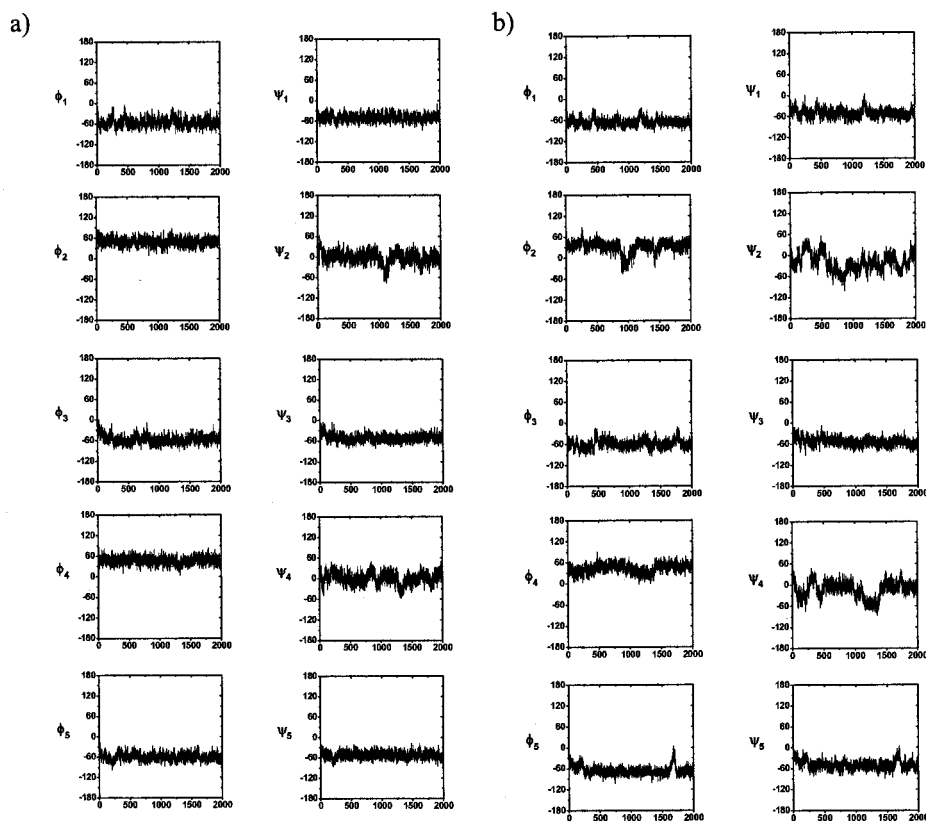


Figura 3.3.12 Historias de las torsiones Φ y Ψ para los 5 enlaces glicosídicos de 1. La numeración sigue el sentido “no-reductor” \rightarrow “reductor” ($f \rightarrow a$). a) modelo 2S_0 ; b) modelo 1C_4 . (2ns MD-PME con H_2O -TIP3P, $\epsilon = 1$, 300 K)

En la **figura 3.3.12** se representan las historias de las torsiones glicosídicas (Φ, Ψ) a lo largo de las simulaciones. Los valores de (Φ, Ψ) promediados a lo largo de la simulación se recogen en la **tabla 3.3.8**. A partir de dicha tabla y de las **figuras 3.3.11** y **3.3.12** se pueden extraer algunas conclusiones. Primeramente cabe destacar que no existe un comportamiento diferencial a lo largo de la secuencia de la molécula, es decir, los dos tipos de uniones glicosídicas presentes, IdoA-GlcN y GlcN-IdoA, no se ven afectadas por su localización a lo largo de la cadena oligosacáridica. En segundo lugar, todas las torsiones Φ_i están bastante bien definidas, oscilando siempre en torno a los

valores que marca el efecto exoanomérico. Sólo para la unión f-e en 1C_4 se visita una región no-exoanomérica, aunque por un tiempo muy limitado, como se puede ver en la curva de distribución de Φ_2 . En cuanto a las torsiones Ψ_i se pueden distinguir dos tipos de comportamientos; para las uniones GlcN-IdoA, dichas torsiones están bien definidas y se limitan a oscilaciones en torno a un valor de $\Psi_i \sim -50^\circ$; sin embargo, para las uniones IdoA-GlcN, las curvas de distribución de Ψ_i se muestran más anchas, indicando, como se puede ver en la **figura 3.3.12**, que las uniones IdoA-GlcN presentan una mayor flexibilidad que las GlcN-IdoA. En la **tabla 3.3.8**, esto se puede ver reflejado en los valores de las desviaciones standard, mucho mayores para dichas torsiones.

	1C_4	2S_0
Φ_1	-65,9 (10,4)	-55,8 (12,1)
Ψ_1	-50,5 (12,3)	-50,3 (10,2)
Φ_2	32,3 (18,1)	49,5 (10,5)
Ψ_2	-20,2 (25,4)	-2,1 (17,4)
Φ_3	-59,7 (12,3)	-56,7 (11,7)
Ψ_3	-53,4 (11,4)	-50,7 (10,3)
Φ_4	43,9 (12,8)	47,2 (10,7)
Ψ_4	-13,2 (23,3)	1,3 (17,3)
Φ_5	-65,9 (12,7)	-59,9 (10,6)
Ψ_5	-49,3 (12,8)	-52,5 (9,8)

Tabla 3.3.8 Valores de (Φ, Ψ) promediados a lo largo de la simulación de dinámica molecular PME. Entre paréntesis se muestran los valores de la desviación standard.

En cuanto al efecto que produce el cambio conformacional del anillo de L-IdoA sobre las torsiones glicosídicas, el único cambio significativo es que la comparación de las curvas de distribución de Ψ_2 y Ψ_4 (**figura 3.3.13**) indica un mayor ensanchamiento en las dinámicas con el anillo de iduronato en 1C_4 . Es importante tener en cuenta que para la unión c-b se produce el cambio conformacional ${}^1C_4 \rightarrow {}^2S_0$ del anillo de L-IdoA a los 400 ps, por lo que su curva de distribución se asemeja bastante más a la correspondiente a una conformación 2S_0 . Interesantemente, la transición ${}^1C_4 \rightarrow {}^2S_0$ para un anillo de L-IdoA tiene

como efecto principal aumentar la “rigidez” de la unión glicosídica IdoA-GlcN a la que pertenece dicho anillo (figura 3.3.12 y 3.3.13). Es decir, la extensión de la dinámica de las zonas que presentan mayor flexibilidad en la molécula, las uniones IdoA-GlcN, está modulada por la conformación del anillo de idurónico implicado.

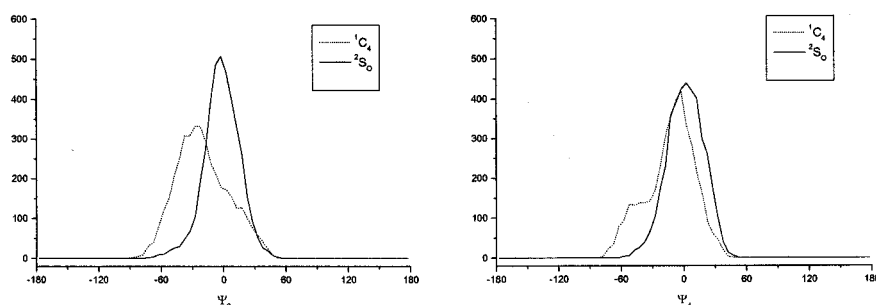


Figura 3.3.13 Curvas de distribución de la torsión glicosídica Ψ_i para las uniones IdoA-GlcN e-d (Ψ_4) y c-b (Ψ_2)

Es arriesgado aventurar una correlación con las actividades biológicas de los glicosaminoglicanos, pero sí cabe destacar que, según se deduce de los datos de actividades biológicas de GAGs que se recogen en la bibliografía, es precisamente el equilibrio conformacional de dicho anillo de idurónico, uno de los elementos necesarios para que los compuestos sean activos en los procesos de mitogénesis inducida por FGFs. Según los datos de dinámica molecular presentados aquí, dicho equilibrio podría tener un efecto sobre la componente entrópica de la interacción, ya que al adoptar la conformación de bote torcido 2S_0 , el número de microestados conformacionales accesibles a la unión glicosídica IdoA-GlcN disminuye, produciéndose una mayor “definición” de la estructura molecular global

3.3.2.1 Aplicación de las simulaciones de dinámica molecular para el estudio comparativo de las estructuras de 2,3, y 4.

En el apartado anterior se demostró que para llevar a cabo estudios de dinámica molecular de glicosaminoglicanos que contengan anillos de L-iduronato

es necesaria la inclusión del disolvente explícito, así como la aplicación de una metodología realmente periódica, PME, para la consideración de las interacciones electrostáticas de largo alcance. El interés que presenta el haber puesto a punto dicha metodología para el modelo 1, es que disponemos, a partir de ahora de una herramienta teórica para el estudio del comportamiento dinámico de los oligosacáridos restantes sintetizados en el laboratorio así como de todos aquellos que se sinteticen en un futuro.

Así pues, en este apartado se presentan los resultados de la aplicación de las simulaciones de dinámica molecular PME a los hexasacáridos 2, 3, y 4.

En las **figuras 3.3.14, 3.3.15, y 3.3.16** se representan las trayectorias de las torsiones glicosídicas de 2, 3, y 4, respectivamente. En la **tabla 3.3.9** se recogen los valores promediados en el tiempo de simulación, junto con las desviaciones standard.

De nuevo, el aspecto más destacable es la diferencia de comportamiento dinámico entre las uniones glicosídicas IdoA-GlcN y GlcN-IdoA, mostrando las primeras, en todos los casos, una mayor variación en los valores de Ψ_i , indicativo de una mayor flexibilidad. Además, para las uniones IdoA-GlcN, las dinámicas moleculares predicen la existencia de conformaciones que se corresponden con valores de Φ_i no exo-anoméricos, aunque generalmente en una pequeña población como puede deducirse del análisis de las curvas de distribución de Φ_i . En algunos casos, las contribuciones de dicha región no exo-anomérica son apreciables, como en el caso de la unión e-d de 2, con e en conformación 2S_0 (**figura 3.3.14**), y las uniones e-d y c-b de 3 con e y c en conformación 2S_0 . Tal y como se dijo en el apartado de mapas relajados, el NOE que caracteriza dicha región es el H2'-H4, que se observa para la unión e-d de 2, pero no puede detectarse para las uniones e-d y c-b de 3 debido al fuerte solapamiento de señales en dicha región. De todas formas, no cabe esperar un NOE muy intenso, debido a que las regiones no exoanoméricas se barren cuando

el anillo está en conformación 2S_0 , que como se vió en el capítulo anterior, es minoritaria, excepto para el residuo **c** de **2**.

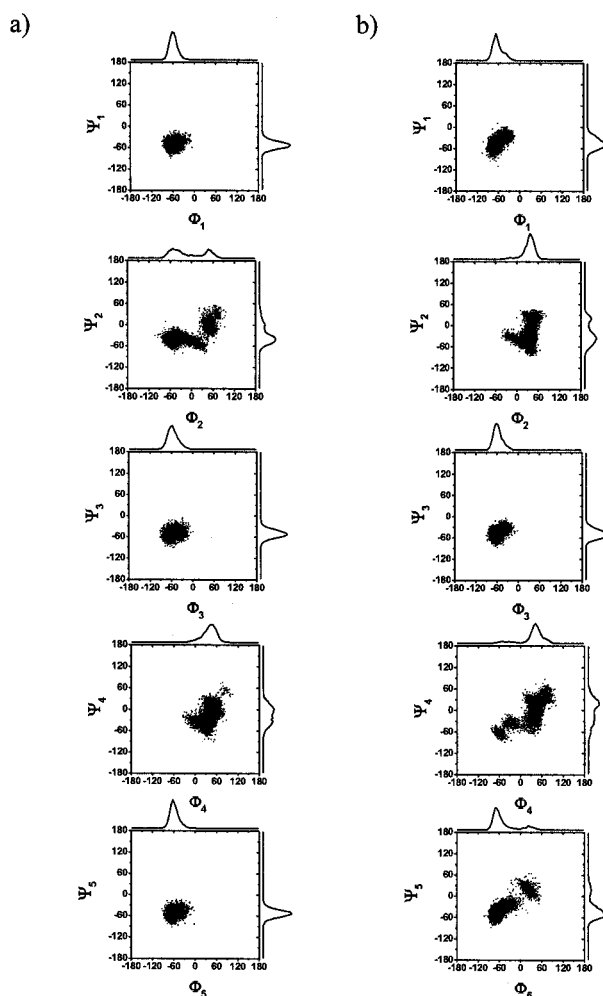


Figura 3.3.14 Trayectorias de las torsiones Φ y Ψ para los 5 enlaces glicosídicos de **2**. La numeración sigue el sentido “no-reductor” \rightarrow “reductor” ($f\rightarrow a$). a) modelo 2S_0 ; b) modelo 1C_4 . (2ns MD-PME con H_2O -TIP3P, $\epsilon = 1$, 300 K)

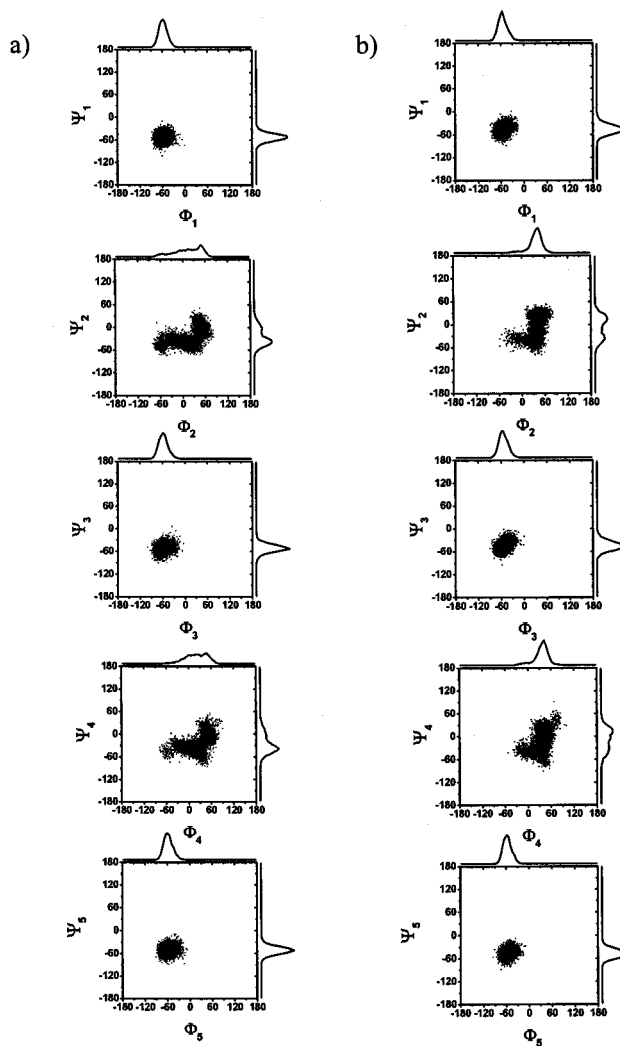


Figura 3.3.15 Trayectorias de las torsiones Φ y Ψ para los 5 enlaces glicosídicos de 3. La numeración sigue el sentido “no-reductor”→”reductor” ($f \rightarrow a$). a) modelo 2S_0 ; b) modelo 1C_4 . (2ns MD-PME con H_2O -TIP3P, $\epsilon = 1$, 300 K)

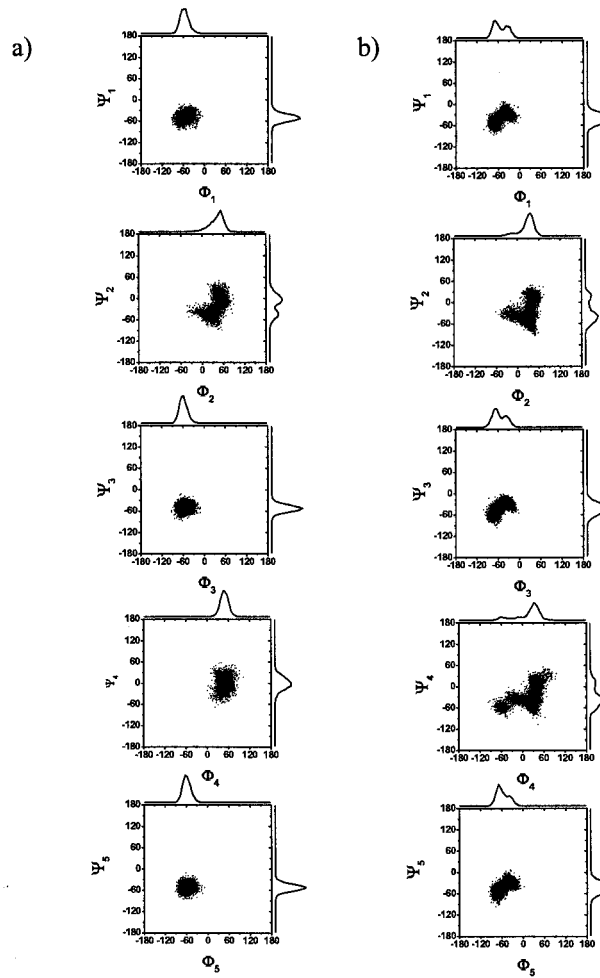


Figura 3.3.16 Trayectorias de las torsiones Φ y Ψ para los 5 enlaces glicosídicos de 4. La numeración sigue el sentido “no-reductor” \rightarrow “reductor” ($f \rightarrow a$). a) modelo 2S_0 ; b) modelo 1C_4 . (2ns MD-PME con H_2O -TIP3P, $\epsilon = 1$, 300 K)

	hexa 2		hexa 3		hexa 4	
	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0
Φ_1	-61,7 (14,4)	-58,5 (11,4)	-54,8 (11,9)	-57,5 (11,2)	-52,8 (19,1)	-55,4 (12,2)
Ψ_1	-45,7 (15,1)	-51,4 (10,3)	-46,4 (11,5)	-51,9 (10,0)	-40,2 (15,2)	-49,9 (10,4)
Φ_2	33,7 (17,0)	-7,5 (46,5)	35,8 (18,5)	14,0 (35,9)	28,5 (19,8)	41,3 (19,4)
Ψ_2	-23,3 (29,2)	-28,3 (24,9)	-7,8 (27,6)	-25,5 (22,3)	-27,5 (29,3)	-17,2 (25,9)
Φ_3	-57,1 (12,7)	-55,3 (13,9)	-53,3 (11,8)	-56,9 (12,3)	-55,4 (18,2)	-57,9 (11,3)
Ψ_3	-48,6 (12,0)	-50,6 (11,1)	-45,3 (11,8)	-51,3 (10,3)	-43,6 (15,5)	-52,1 (9,6)
Φ_4	34,3 (33,3)	39,9 (19,5)	35,7 (19,0)	19,5 (29,7)	17,0 (34,9)	49,0 (11,7)
Ψ_4	0,4 (32,2)	-14,5 (24,8)	-7,4 (27,8)	-27,0 (23,2)	-27,6 (28,1)	-0,9 (17,7)
Φ_5	-49,4 (34,0)	-58,2 (12,2)	-56,2 (11,2)	-57,0 (11,9)	-56,4 (17,0)	-58,5 (11,2)
Ψ_5	-36,2 (27,2)	-51,9 (10,6)	-47,3 (10,7)	-51,6 (10,2)	-43,0 (15,5)	-51,6 (9,8)

Tabla 3.3.9 Valores de (Φ , Ψ) promediados a lo largo de la simulación de dinámica molecular PME. Entre paréntesis se muestran los valores de la desviación estandard.

Nuevamente, el análisis de los anchos de las curvas de distribución de Ψ_i , para las uniones IdoA-GlcN, indica una mayor variación para dicha unión cuando el anillo de L-IdoA está en conformación 1C_4 , lo que se refleja en las desviaciones standard de Ψ_2 y Ψ_4 , comparando 1C_4 con 2S_0 (tabla 3.3.9).

En la figura 3.3.17 se muestran las historias de la coordenada azimutal de plegamiento, ϕ_2 , para cada uno de los residuos de L-IdoA en 2, 3, y 4, para los modelos con una conformación inicial 2S_0 . En todas las gráficas, el valor de la coordenada polar es de $\theta = 90^\circ$ (curvas no mostradas, por simplicidad). El análisis de la figura 3.3.17 pone claramente de manifiesto la estabilidad que presenta el bote torcido 2S_0 a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular, ya que las curvas de distribución de ϕ_2 muestran un máximo para 150° en todos los casos, independientemente de la sulfatación o no de la posición 2. No obstante, sí se pueden destacar algunas diferencias con respecto a 1. En primer lugar, las simulaciones predicen que en algunos casos se accede a la conformación de bote torcido 5S_1 , y determinadas curvas de distribución (anillo a de 3, y los anillos a,c, y e de 4) presentan un hombro en torno al valor de $\phi_2 = 90^\circ$, que corresponde a dicho bote torcido.

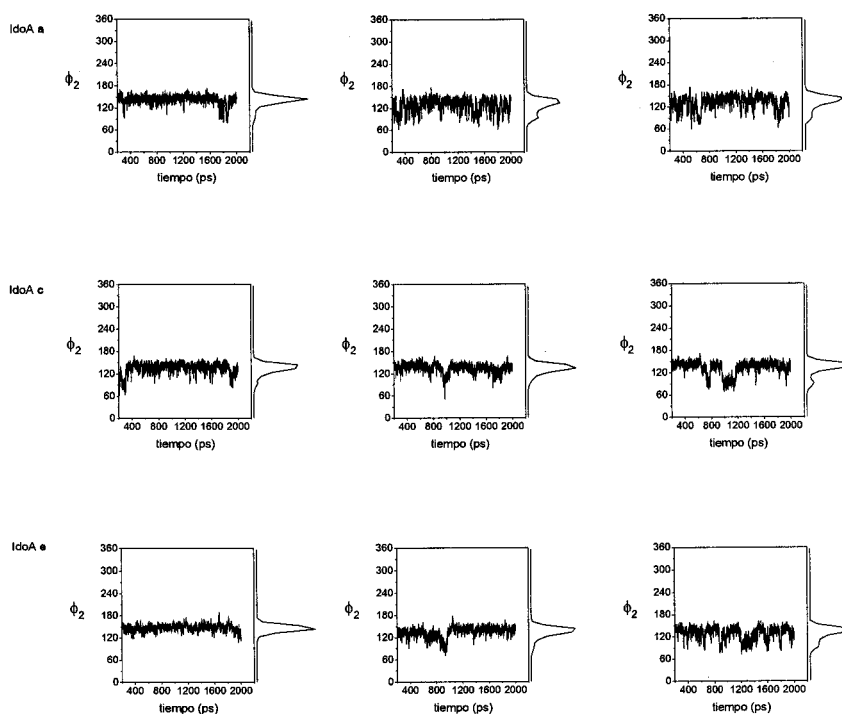


Figura 3.3.17 Evolución de las coordenadas de plegamiento ϕ_2 y θ para los residuos de *L*-iduronato de 2, 3, y 4 (modelo 2S_0), de izquierda a derecha. (2ns MD-PME con H_2O -TIP3P, $\epsilon = 1$, 300 K). Para ϕ_2 se muestran las curvas de distribución

En la **tabla 3.3.10** se recogen los valores de las constantes de acoplamiento vecinales promediadas a lo largo del tiempo de simulación (se descartaron los 200 ps iniciales), y en la **tabla 3.3.11** los resultados del ajuste mediante mínimos cuadrados de los valores promediados con los valores experimentales.

Modelo inicial:	Residuo					
	a		c		e	
	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0	1C_4	2S_0
	hexa 2					
$J_{H,H}$						
H1-H2	1,9 ± 0,6	6,5 ± 1,0	2,0 ± 0,6	6,5 ± 1,0	2,0 ± 0,6	6,0 ± 1,0
H2-H3	2,4 ± 1,0	9,9 ± 1,1	3,2 ± 1,0	9,3 ± 1,5	2,6 ± 1,0	10,0 ± 0,6
H3-H4	2,2 ± 0,9	5,3 ± 1,9	2,9 ± 1,0	4,5 ± 2,1	2,3 ± 0,9	5,6 ± 1,6
H4-H5	1,6 ± 0,9	3,5 ± 1,5	1,2 ± 0,7	2,8 ± 1,5	1,6 ± 0,9	3,9 ± 1,4
	hexa 3					
$J_{H,H}$						
H1-H2	2,1 ± 0,6	6,83 ± 1,0	2,0 ± 0,6	6,61 ± 0,9	2,1 ± 0,6	6,51 ± 1,0
H2-H3	3,2 ± 1,0	8,79 ± 1,7	3,2 ± 1,0	9,36 ± 1,1	3,2 ± 1,0	9,30 ± 1,3
H3-H4	2,8 ± 0,9	3,75 ± 2,2	2,9 ± 0,9	4,46 ± 1,9	2,9 ± 0,9	4,50 ± 1,9
H4-H5	1,2 ± 0,7	2,35 ± 1,5	1,1 ± 0,7	2,76 ± 1,4	1,2 ± 0,7	2,77 ± 1,4
	hexa 4					
$J_{H,H}$						
H1-H2	2,0 ± 0,6	6,7 ± 1,1	1,9 ± 0,6	6,7 ± 1,0	2,09 ± 0,6	6,9 ± 1,0
H2-H3	2,6 ± 1,0	9,2 ± 1,5	2,6 ± 1,0	9,2 ± 1,6	2,66 ± 1,0	9,1 ± 1,5
H3-H4	2,2 ± 0,9	4,4 ± 2,2	2,2 ± 0,9	4,4 ± 2,1	2,29 ± 0,9	3,8 ± 2,1
H4-H5	1,6 ± 0,8	2,8 ± 1,6	1,6 ± 0,9	2,8 ± 1,5	1,58 ± 0,8	2,3 ± 1,4

Tabla 3.3.10 Acoplamientos vecinales H-H promediados a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular PME de 2, 3, y 4.

El análisis de la **tabla 3.3.11** indica que, efectivamente, existe una determinada población de bote torcido 5S_1 para determinados anillos de L-IdoA, aunque en todos los casos siempre es una población $\leq 10\%$. El ajuste con los datos experimentales vuelve a ser razonable, con errores, χ^2 , del mismo orden que para el ajuste a conformaciones canónicas 1C_4 y 2S_0 , o incluso inferiores en muchos casos.

Por lo tanto, los resultados del estudio de las constantes de acoplamiento, para los anillos de L-iduronato en 1, 2, 3, y 4 indican que, efectivamente, la conformación de bote torcido 2S_0 es la mayoritaria en espacio pseudorrotacional accesible, independientemente del grado de sustitución del oligosacárido. Sin

embargo, la imagen que ofrecen las dinámicas no es la de una conformación estática relativamente rígida, como ocurre con las conformaciones de silla, sino más bien una conformación con un elevado grado de flexibilidad, y la extensión de dicha flexibilidad depende sensiblemente del patrón de sustitución, probablemente debido a las diferentes distribuciones de cargas parciales que presentan los hexasacáridos.

Residuo	Población de conformeros (%)					χ^2
	1C_4	1S_5	2S_0	5S_1	3S_1	
hexa 2						
a	64		34	2		0.4
c	47		47	6		1.4
e	59		41			0.5
hexa 3						
a	66		24	10		1.2
c	71		26	3		1.6
e	72		25	3		1.6
hexa 4						
a	70		24	6		1.1
c	63		31	6		2.8
e	70		23	7		1.9

Tabla 3.3.11 Poblaciones de conformeros obtenidas mediante ajuste entre las constantes $\langle {}^3J_{H,H} \rangle$ promediadas a lo largo de las dinámicas moleculares y las experimentales.

3.4 CONCLUSIONES

El estudio teórico mediante modelización molecular llevado a cabo sobre los hexasacáridos modelos de heparina y sulfato de heparano, 1, 2, 3, y 4, han puesto de manifiesto:

1. *Los mapas relajados para los distintos tipos de uniones glicosídicas presentes en 1, 2, 3, y 4, en conjunción con los datos de NOEs interglicosídicos, indican que los distintos patrones de sustitución no inducen ningún cambio conformacional importante al nivel de las torsiones glicosídicas, y por lo tanto predicen una geometría global similar para los 4 hexasacáridos.*
2. *La comparación de las predicciones de los mapas, los NOEs interglicosídicos de 1, 2, 3, y 4, y las torsiones glicosídicas de la heparina natural y un hexasacárido derivado de ésta, por despolimerización química, indican que para los 4 hexasacáridos, los datos experimentales son compatibles con una geometría global de hélice a derechas, en la que, dependiendo del patrón de sulfatación, se localizarán grupos sulfatos en polos opuestos en torno al eje molecular (1, 3, y 4), o en uno solo de los polos (2), originando, de esta forma, una distribución asimétrica de grupos sulfato.*
3. *El estudio comparativo de las distintas consideraciones para modelizar el disolvente en simulaciones de dinámica molecular, llevado a cabo sobre el hexasacárido 1, ha puesto claramente de manifiesto que para reproducir correctamente los datos experimentales (NOEs intrarresiduales y constantes de acoplamiento vecinales) correspondientes a los anillos de L-iduronato es necesaria la inclusión de disolvente explícito, así como hacer uso de una metodología "verdaderamente periódica" tal como la de sumas de Ewald "partícula-malla" (PME). La conformación de bote torcido 2S_0 es un mínimo energético dinámicamente estable sin necesidad de restricciones*

experimentales que fueren al sistema hacia posibles “conformeros virtuales”.

4. Las simulaciones de dinámica molecular con la metodología PME son capaces de predecir transiciones conformacionales complejas, sin la necesidad de introducir restricciones experimentales, tal como la transición silla ${}^1C_4 \rightarrow$ bote torcido 2S_0 . Esto demuestra que este tipo de simulaciones no produce una sobreestabilización de la conformación de partida, así como constituye la primera simulación para estas biomoléculas en las que se ha podido observar dicha transición espontáneamente.
5. Las simulaciones de dinámica molecular PME confirman que la disposición geométrica *syn-Ψ* es dinámicamente estable, y no se predicen pasos por mínimos *anti-Ψ*. Las regiones barridas por las torsiones glicosídicas son las que se predicen en los mapas relajados, y confirman la estabilidad dinámica de la geometría molecular helicoidal. Los puntos de mayor flexibilidad lo constituyen las uniones *IdoA-GlcN*, y la extensión de dicha flexibilidad está modulada por la conformación del anillo de *L-IdoA*. Al adoptar la conformación de bote torcido 2S_0 , se produce una disminución de dicha flexibilidad.

3.5 PARTE EXPERIMENTAL

3.5.1 Mecánica Molecular. Mapas relajados.

Las estructuras de los modelos disacarídicos iniciales se construyeron con el programa de modelado molecular SYBYL (<http://www.tripos.com>). Se incorporaron a su librería de carbohidratos los residuos de D-glucosamina y L-iduronato, con los distintos patrones de sustitución que aparecen en los modelos de heparina/sulfato de heparano, recogidos de la base de datos del CERMAV, localizada en <http://www.cermav.cnrs.fr/databank/>. Dichos residuos contienen ya el conjunto de cargas parciales y presentan tipos de átomos especiales para trabajar con el conjunto de parámetros para carbohidratos PIM¹¹ desarrollado como ampliación del campo de fuerzas general TRIPOS¹⁰.

Los 18 modelos disacarídicos iniciales se construyeron con el programa SYBYL disponiendo los grupos exocíclicos importantes (2,6-GlcN; y 2-IdoA) de acuerdo con las estructuras publicadas por Mulloy et al. para la heparina natural (entrada base de datos PDB: 1hpn.pdb), y que están de acuerdo con los datos de RMN. Los restantes grupos hidroxilo se dispusieron de forma que se originase el mayor número de interacciones por enlace de hidrógeno posibles. En todos los casos se consideró una sólo orientación de dichos grupos exocíclicos (no se realizaron mapas adiabáticos). A cada estructura inicial se le asignaron los valores (Φ, Ψ) de la heparina (1hpn.pdb) y se sometió a una minimización suave de 100 iteraciones de gradientes conjugados (método Powell⁵⁶) para eliminar malos contactos iniciales. En todos los casos se hizo uso de una constante dieléctrica $\epsilon = 80$, y una distancia de truncado de 9 Å (cutoff) para las interacciones de no-enlace. Se generaron 324 confórmeros para cada modelo, por rotación sistemática de Φ y Ψ entre -180° y $+180^\circ$, partiendo de la estructura inicial y utilizando incrementos $\Delta\Phi$ $\Delta\Psi$ múltiplos de 20° . Cada una de las estructuras de este mapa rígido se sometió a una minimización energética con el algoritmo Powell (gradientes conjugados) hasta que la variación en el gradiente de energía fue menor que $0.01 \text{ Kcal/mol}\cdot\text{Å}$.

Para el procesado gráfico de los datos se hizo uso del programa Microcal Origin 5.0 (<http://www.microcal.com>).

3.5.2 Simulaciones de Dinámica Molecular.

Las estructuras de partida se construyeron, en la primera etapa de asignación de coordenadas (x_i , y_i , z_i), con el paquete de modelado molecular Sybyl. Para el hexasacárido **1** se tomaron como referencia las coordenadas cartesianas atómicas del fragmento hexasacarídico central de los modelos dodecasacarídicos de heparina natural depositados en el banco de datos de proteínas (PDB). Los grupos sulfoniloximetilo se dispusieron en conformación *gg*. Para las moléculas **2**, **3**, y **4**, la construcción se hizo tomando la misma referencia, y, para aquellos grupos diferentes, se consideró lo siguiente: los grupos hidroximetilo (**2**, y **4**) se dispusieron análogamente en *gg*; los grupos hidroxilo en 2-IdoA (**2**, y **3**) se dispusieron tomando como referencia la torsión H2-C2-O2-S de la heparina natural; el grupo acetamido (**2**) se dispuso con H2-C2-N2-H = 180°, de acuerdo con los datos de RMN existentes para la heparina natural N-acetilada ($^3J_{NH,CH_2} = 9.4$ Hz). Para cada uno de los 4 hexasacáridos se consideraron 2 modelos: uno con todos los anillos de L-iduronato en conformación de silla 1C_4 , y otro con todos en bote torcido 2S_0 . Las cargas parciales de los residuos fueron tomadas de la base de datos de monosacáridos localizada en el CERMAV (<http://www.cermav.cnrs.fr/databank/mono/>) con ligeras modificaciones en los átomos C4 glicosidados, después de la unión de los residuos, para preservar la carga total de cada molécula (-12 para **1**; -8 para **2**; -9 para **3** y **4**).

Para la utilización de dichas estructuras en el programa AMBER los distintos tipos de residuos presentes en **1**, **2**, **3** y **4** se construyeron manualmente y se incluyeron en la librería de residuos de AMBER con el módulo PREP, incluido en dicho programa de modelado. Para ello, se tomaron como referencia los residuos de la base de datos del CERMAV y se modificaron convenientemente los tipos de átomos para compatibilizarlos con las definiciones

del campo de fuerzas AMBER-GLYCAM. Una vez unidos los residuos con el módulo LINK, las estructuras anteriores construidas en Sybyl sirvieron como ficheros de entrada para el programa EDIT y PARM para la asignación de la topología adecuada. De esta forma se obtuvieron los ficheros de topología y de coordenadas listos para trabajar con el campo de fuerzas AMBER-GLYCAM más una modificación específicamente desarrollada para los grupos sulfato en las posiciones en las que aparecen en los modelos de heparina. El conjunto de parámetros del campo de fuerzas base (AMBER) fue "parm91", ya que tanto GLYCAM 93, como la parametrización de sulfatos, fueron desarrollados en el marco de dicha versión del campo de fuerzas.

Simulaciones "in vacuo"

Tanto para las dinámicas con $\epsilon = 80$ como para aquellas con $\epsilon=5r$ (sólo hexasacárido 1) el protocolo seguido fue el mismo. La estructura de partida se sometió a una minimización energética de 200 etapas con el algoritmo de "descenso pronunciado" seguido por una minimización con el algoritmo de "gradientes conjugados" hasta que el gradiente energético fue inferior a 0.0001 Kcal/mol·Å. A esta minimización le siguieron 15 ps de dinámica molecular para la equilibración de la temperatura, que comenzó asignando directamente una distribución de Maxwell de velocidades atómicas iniciales correspondiente a una temperatura de 298 K. La temperatura fue controlada mediante el algoritmo de Berendsen de acoplamiento a un baño térmico con una constante de 0.5 ps. El tiempo de integración fue de 1.5 fs, la lista de pares de no-enlace se actualizó cada 25 etapas de integración y la distancia límite para el truncado de estas interacciones (cutoff) se estableció en 15 Å. Se hizo uso del algoritmo SHAKE para la restricción de los movimientos de alta frecuencia en los enlaces que implican átomos de hidrógeno, para asegurar la estabilidad de la integración por pasos de las ecuaciones de Newton. Las simulaciones se realizaron en el colectivo canónico NVT (n° de partículas, volumen, y temperatura constantes).

Tras esta equilibración la dinámica "productiva" consistió en 14 ns de dinámica a 298 K, con las condiciones de simulación detalladas anteriormente, guardando el conjunto de coordenadas atómicas cada 0.1 ps.

Simulaciones con disolvente explícito

Las estructuras resultantes de PREP, LINK, EDIT, y PARM, se sometieron a una minimización "in vacuo", para eliminar malos contactos iniciales. Esta minimización consistió en 200 etapas de "descenso pronunciado" seguido por minimización con "gradientes conjugados" hasta que el gradiente energético fue inferior a 0.01 Kcal/mol·Å. La constante dieléctrica utilizada fue $\epsilon = 5 \cdot r$, con un cutoff de 30 Å (aproximadamente el largo de la molécula). Las estructuras minimizadas se neutralizaron electrostáticamente por adición del número adecuado de iones Na^+ , colocados inicialmente de acuerdo con el potencial electrostático molecular (comando "addions" en el programa xleap, dentro de AMBER 5.0), y alejados manualmente de forma radial respecto al eje molecular a una distancia apropiada para permitir la adecuada solvatación del ión sin la interferencia del soluto. Tras esta etapa, las moléculas se "sumergieron" en cajas de moléculas de agua TIP3P. En todas las simulaciones se hizo uso de condiciones de contorno periódicas (PBC).

Disolvente explícito con tratamiento electrostático "clásico" (truncado de las interacciones electrostáticas de largo alcance)

Las simulaciones se llevaron a cabo con el módulo de cálculo "sander" en AMBER 5.0 haciendo uso del algoritmo SHAKE con una tolerancia de 0.0005 Å y 1 fs de tiempo de integración para las ecuaciones de Newton. Para las interacciones de no-enlace se hizo uso de un cutoff basado en residuos de 9 Å, y la lista de pares se actualizó cada 25 etapas de integración. Para mantener la temperatura constante se aplicó el algoritmo de Berendsen con una constante de tiempo de 0.2 ps.

Los datos del sistema (hexasacárido 1) se recogen en la siguiente tabla:

Modelo	Tamaño	N° moléculas	N° iones	N° átomos	N° total
	Caja (\AA^3)	H ₂ O	Na ⁺	soluto	átomos
¹ C ₄	40 x 45 x 55	2195	12	162	6759
² S ₀	55 x 45 x 43	2474	12	162	7596

El período de equilibración se inició con 100 ciclos de minimización con "descenso pronunciado" seguido por una minimización completa con "gradientes conjugados" hasta que el gradiente fue < 0.01 Kcal/mol· \AA , manteniendo las posiciones del soluto fijadas con una constante de 1000 Kcal/mol· \AA^2 . Tras esta etapa se llevaron a cabo 25 ps de dinámica molecular en el colectivo isotérmico-isobárico NPT, una vez más con las posiciones del soluto fijadas, asignando las velocidades iniciales por medio de una distribución de Maxwell a 298 K. Esta simulación permite la equilibración de la densidad del sistema, en torno al valor de 1 g/cm³, eliminando las posibles "burbujas" que se pueden originar como consecuencia de imperfecciones en el algoritmo de inmersión del soluto en la caja. Este período de equilibración fue seguido por varios nanosegundos de dinámica "productiva" en el colectivo NVT. Las coordenadas del sistema se guardaron en el fichero de trayectoria cada 0.5 ps.

Disolvente explícito con tratamiento Ewald Partícula-Malla para las interacciones electrostáticas de largo alcance

Para estas simulaciones se hizo uso del módulo de cálculo "sander" del programa AMBER 6.0. Se aplicó el algoritmo SHAKE, con una tolerancia de 0.0001 \AA , y un tiempo de integración de 2 fs. Para las interacciones tipo Lennard-Jones se aplicó un cutoff basado en residuos de 9 \AA , y la lista de pares se actualizó cada 10 etapas de integración. La temperatura de 300 K se mantuvo constante utilizando el algoritmo de Berendsen con una constante de tiempo de 0.2 ps. Todas las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo en el colectivo NPT, manteniendo la presión a 1 bar. Para evitar el fenómeno del

conocido como "flying ice cube" (incremento en la energía de traslación del centro de masas como consecuencia de que el algoritmo de reescalado de velocidades produce el trasvase de energía cinética desde los movimientos de alta frecuencia a los de baja) se eliminaron periódicamente las traslaciones y las rotaciones en torno al centro de masas.

Los datos de los distintos sistemas se recogen en la siguiente tabla:

Hexa	Modelo	Tamaño	Nº mol.	Nº iones	Nº átomos	Nº total
		Caja (Å ³)	H ₂ O	Na ⁺	soluto	átomos
1	¹ C ₄	54 x 50 x 48	3858	12	162	11748
	² S ₀	54 x 50 x 48	3893	12	162	11853
2	¹ C ₄	53 x 50 x 50	3933	8	155	11962
	² S ₀	54 x 51 x 49	3908	8	155	11887
3	¹ C ₄	50 x 50 x 51	3724	9	153	11334
	² S ₀	50 x 50 x 51	3689	9	153	11229
4	¹ C ₄	50 x 52 x 49	3759	9	153	11439
	² S ₀	51 x 51 x 51	3833	9	153	11661

El período de equilibración consistió en 11 etapas consecutivas. Comenzó con 1000 ciclos de minimización con "descenso pronunciado" manteniendo las posiciones de soluto y contraiones fijadas con una constante de restricción de 500 Kcal/mol·Å², eliminando de esta forma los malos contactos iniciales. Para la relajación de la estructura inicial del disolvente y la equilibración de la densidad del sistema, se realizaron 25 ps de dinámica a presión constante, con tratamiento de cutoff para las interacciones electrostáticas, de nuevo permitiendo el movimiento solamente de las moléculas de agua. Tras este punto, todas las simulaciones se llevaron a cabo haciendo uso del tratamiento PME (Particle Mesh Ewald) para las interacciones electrostáticas de largo alcance. El espaciado de la malla de cargas fue de aproximadamente 1 Å, con una interpolación *B-spline* cúbica y una tolerancia para la suma directa de $1 \cdot 10^{-6}$. Para las

simulaciones de dinámica molecular las velocidades iniciales se asignaron mediante una distribución de Maxwell a la temperatura de partida. De esta forma, la equilibración se continuó con 25 ps de dinámica con los átomos de soluto fijados con una restricción posicional de 500 Kcal /mol· Å². Tras esto, se realizaron 1000 ciclos de minimización energética con las posiciones del soluto restringidas en 25 Kcal /mol· Å², seguido por 3 ps de dinámica molecular con la misma restricción. Para finalizar la equilibración se realizaron 5 minimizaciones energéticas consecutivas de 600 etapas cada una, con una restricción posicional disminuyendo en 5 Kcal /mol· Å² cada vez, empezando con 20 Kcal /mol· Å² y finalizando sin restricción. La dinámica productiva comenzó con un ligero calentamiento del sistema de 100 a 300 K. Una vez equilibrada la temperatura, se realizaron 2 ns de dinámica molecular, salvando las coordenadas del sistema al fichero de trayectoria cada 0.5 ps.

El análisis de los datos resultantes de las dinámicas moleculares, en todos los casos se llevó a cabo a través del módulo CARNAL incluido en el paquete AMBER (5.0 y 6.0). Para el procesado gráfico de los resultados se hizo uso del programa Microcal Origin 5.0 (<http://www.microcal.com>).

BIBLIOGRAFÍA

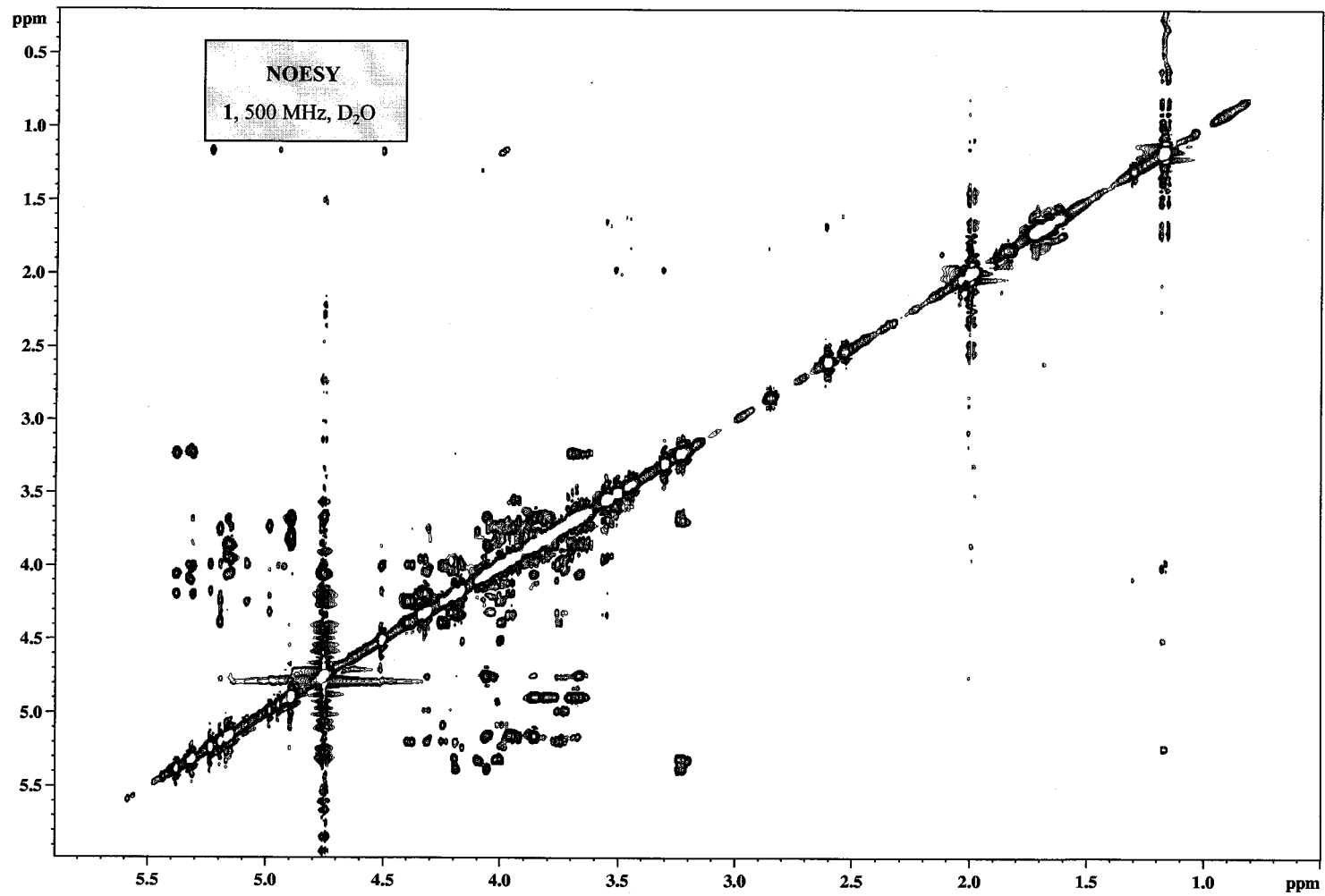
- ¹ a) Lemieux R.U., Bock K., Delbaere L.T.J., Koto S., Rao V.S., *Can. J. Chem.*, **1980**, 58, 631 ; b) Praly J.P., Lemieux R. U., *Can. J. Chem.*, **1987**, 65, 213 ; c) Thorgensen H., Lemieux R.U., Bock K., Mayer B., *Can. J. Chem.*, **1982**, 60, 44
- ² Wolfe S., Whangbo M.-H., Mitchell D.J., *Carbohydr. Res.*, **1979**, 69, 1.
- ³ Thøgersen H., Lemieux R.U., Bock K., Meyer B., *Can. J. Chem.*, **1982**, 60, 44.
- ⁴ Bock K., *Pure Appl. Chem.*, **1983**, 55, 605.
- ⁵ Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M., *J. Comp. Chem.*, **1983**, 4, 187-217.
- ⁶ Ha S.N., Giammona A., Field M., Brady J.W., *Carbohydr. Res.*, **1988**, 180, 207-221.
- ⁷ a) van Gunsteren W.F., *GROMOS: Groningen Molecular Simulation Program Package*, **1987**, University of Groningen, The Netherlands. b) Prabhakaran M., Harvey S.C., *Biopolymers*, **1987**, 26, 1087.
- ⁸ Hagler A.T., Lifson S., Dauber P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 5122.
- ⁹ a) Asensio J.L., López R., Fernández-Mayoralas A., Jiménez-Barbero J., *Tetrahedron*, **1994**, 50, 6417.; b) Asensio J.L., Martín-Pastor M., Jiménez-Barbero J., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1995**, 17, 137-148.
- ¹⁰ Clark M., Cramer-III R.D., Van Opdenbosch N., *J. Comp. Chem.*, **1989**, 10, 982-1012.
- ¹¹ a) Perez S., Meyer C., Imberty A., *Modelling of Biomolecular Structures and Mechanisms*, **1995**, A. Pullman, J.Jortner & B. Pullman (eds.) Kluwer Academic Press, Dordrecht, 425-444; b) Imberty A., Hardman K.D., Carver J.P., Perez S., *Glycobiology*, **1991**, 1, 631-642.
- ¹² Allinger N.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 8127-8134.
- ¹³ Allinger N.L., Yuh Y.H., Lii J.-H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8551-8566..
- ¹⁴ Tvaroska I., Pérez I., *Carbohydr. Res.*, **1986**, 149, 389-410.
- ¹⁵ Weiner S.J., Kollman P.A., Case D.A., Singh U.C., Ghio C., Alagona G., Profeta Jr. S., Weiner P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 765-784.
- ¹⁶ Weiner S.J., Kollman P.A., Nguyen D.T., Case D.A., *J. Comput. Chem.*, **1986**, 7, 230-252.
- ¹⁷ Homans S.W., *Biochemistry*, **1990**, 29, 9110-9118.
- ¹⁸ Homans S.W., Forster M., *Glycobiology*, **1992**, 2, 143.
- ¹⁹ Rutherford T.J., Partridge J., Weller C.T., Homans S.W., *Biochemistry*, **1993**, 32, 12715.

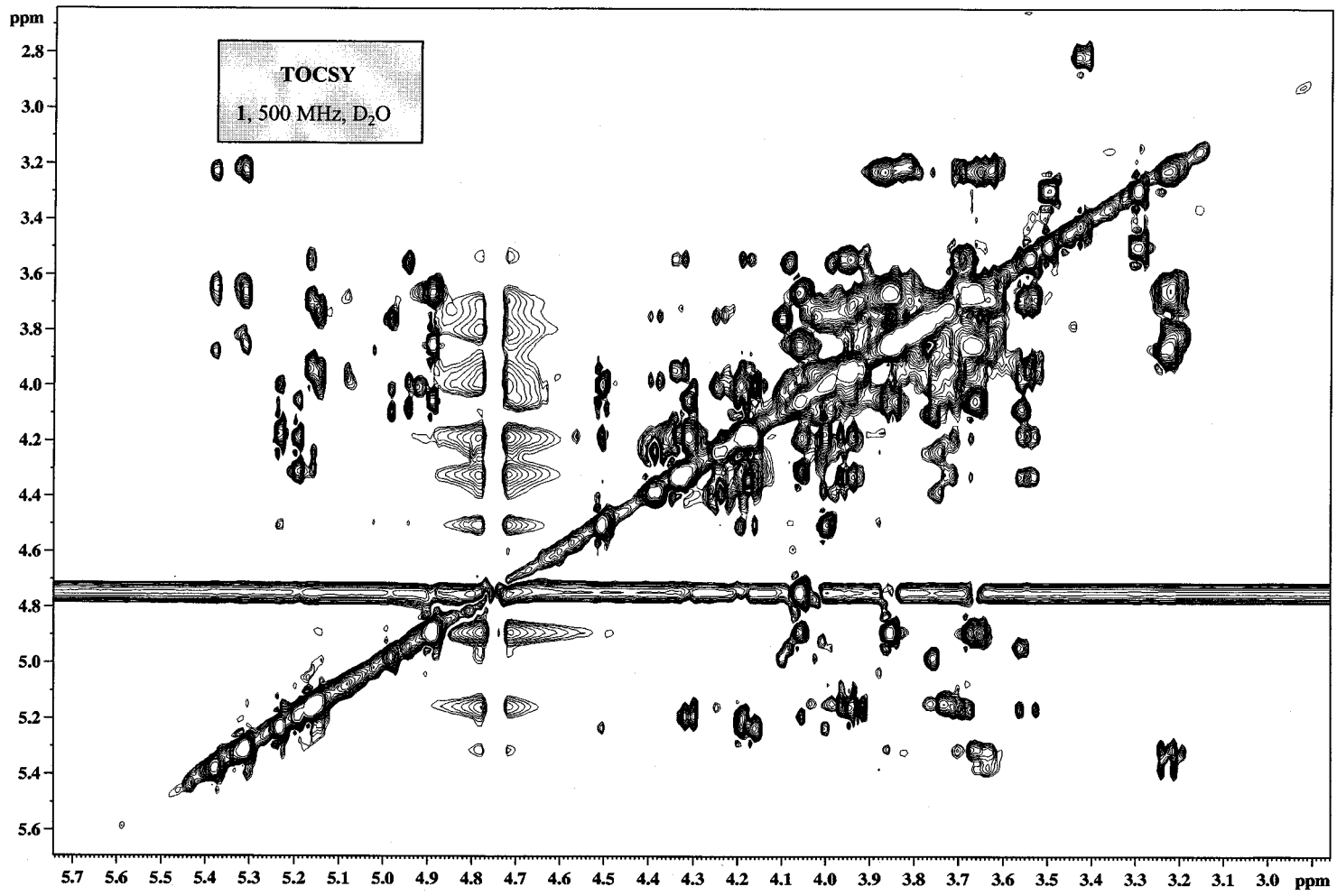
- ²⁰ Rutherford T.J., Spackman D.G., Simpson P.J., Homans S.W., *Glycobiology*, **1994**, 4, 59.
- ²¹ Glennon T.M., Zheng Y.-J., Le Grand S.M., Schutzberg B.A., Merz Jr. K.M., *J. Comp. Chem.*, **1994**, 15, 1019-1040.
- ²² Woods R.J., Dwek R.A., Edge C.J., Fraiser-Reis B.J., *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 3832-3846.
- ²³ Pérez S., Imberty A., Engelsen S.B., Gruza J., Mazeau K., Jiménez-Barbero J., Poveda A., Espinosa J.-F., van Eyck B.P., Johnson G., French A.D., Kouwijzer M.L.C.E., Grootenuis P.D.J., Bernardi A., Raimondi L., Senderowitz H., Durier V., Vergoten G., Rasmussen K., *Carbohydr. Res.*, **1998**, 314, 141-155.
- ²⁴ Rao V.S.R., Yathindra N., Sundararajan P., *Biopolymers*, **1969**, 8, 325.
- ²⁵ Asensio J.L., Jiménez-Barbero J., *Biopolymers*, **1995**, 35, 55-73.
- ²⁶ Ferro D.R., Pumilia A., Cassarini A., Ragazzi M., *J. Comp. Chem.*, **1995**, 17, 131-135.
- ²⁷ Ferro D.R., Pumilia A., Ragazzi M., *J. Comp. Chem.*, **1997**, 18, 351-367.
- ²⁸ Huige C.J., Altona C., *J. Comp. Chem.*, **1995**, 16, 56-79.
- ²⁹ Asensio J.L., Martín-Pastor M., Jiménez-Barbero J., *Int. J. Biol. Macromol.*, **1995**, 17, 137-148.
- ³⁰ Mulloy B., Forster M.J., *Glycobiology*, **2000**, 10, 1147-1156.
- ³¹ a) Mulloy B., Forster M.J., Jones C., Davies D.B., *Biochem. J.*, **1993**, 293, 849-858; b) Mulloy B., Forster M. J., Jones C., Drake A. F., Johnson E. A., Davies D. B., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 255, 1-26.
- ³² a) Mikhailov D., Mayo K.H., Vlahov I.R., Toida T., Pervin A., Linhardt R.J., *Biochem. J.*, **1996**, 318, 93-102; b) Mikhailov D., Linhardt R.J., Mayo K.H., *Biochem. J.*, **1997**, 328, 51-61.
- ³³ Ragazzi M., Ferro D.R., Provasoli A., *J. Comp. Chem.*, **1986**, 7, 105-112.
- ³⁴ Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Torri G., Casu B., Gatti G., Jacquinet J.-C., Sinay P., Petitou M., Choay J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 106, 6773-6778.
- ³⁵ Cremer D., Pople J.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 1354-1358.
- ³⁶ Forster M.J., Mulloy B., *Biopolymers*, **1993**, 33, 575-588.
- ³⁷ Homans S.W., *Biochemistry*, **1990**, 29, 9110-9118.
- ³⁸ Juan Luis Asensio Álvarez, *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, **1995**.
- ³⁹ Ragazzi M., Ferro D.R., Provasoli A., *J. Comp. Chem.*, **1986**, 7, 105-112.
- ⁴⁰ Ferro D.R., Provasoli A., Ragazzi M., Torri G., Casu B., Gatti G., Jacquinet J.-C., Sinay P., Petitou M., Choay J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 6773-6778.

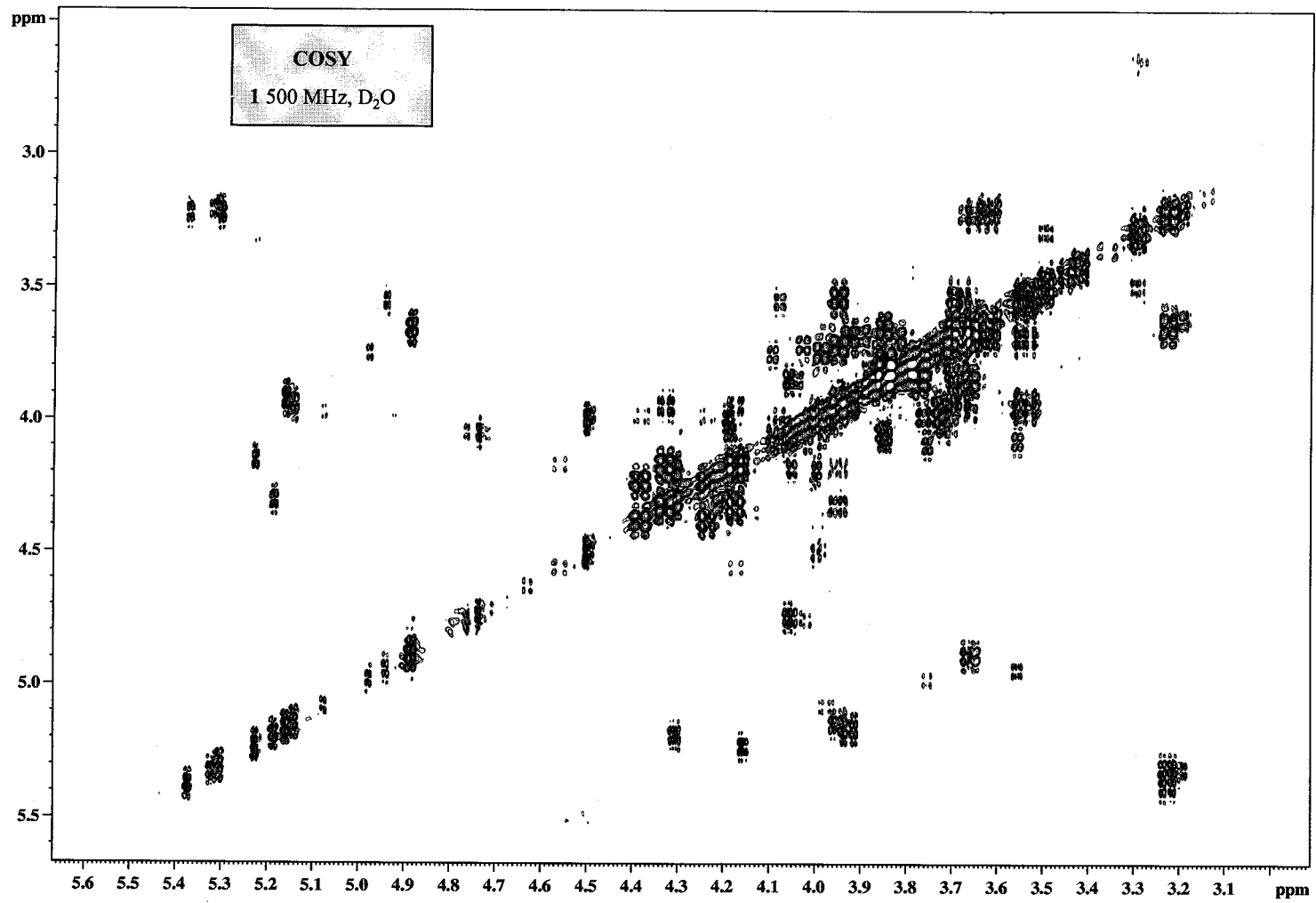
- ⁴¹ Forster M.J., Mulloy B., *Biopolymers*, **1993**, 33, 575-588.
- ⁴² Mulloy B., Forster M. J., Jones C., Drake A. F., Johnson E. A., Davies D. B., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 255, 1-26.
- ⁴³ Leach A.L., *Molecular Modelling, Principles and Applications*, **2001**, Pearson Education Ltd.
- ⁴⁴ van Gunsteren W.F, Berendsen H.J.C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, 29, 992-1023.
- ⁴⁵ Cheatham III T.E., Miller J.L., Fox T., Darden T.A., Kollman P.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 4193-4194.
- ⁴⁶ Cheatham III T.E., Brooks B.R., *Theor. Chem. Acc.*, **1998**, 99, 279-288.
- ⁴⁷ Cheatham III T.E., Kollman P.A., *J. Mol. Biol.*, **1996**, 259, 434-444.
- ⁴⁸ a) Schreiber H., Steinhauser O., *Biochemistry*, **1992**, 31, 5956; b) Schreiber H., Steinhauser O., *Chem. Phys.*, 168, 75.
- ⁴⁹ Darden T.A., York D., Pedersen L.D., *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 10089-10092.
- ⁵⁰ Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T.A., Lee H., Pedersen L.G., *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103(19), 8577-8593.
- ⁵¹ Petersen H.G., *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103, 3668-3679.
- ⁵² Špacková N., Berger I., Šponer J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5519-5534.
- ⁵³ Hamelberg D., McFail-Isom L., Williams L.D., Wilson W.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 10513-10520.
- ⁵⁴ Luty B.A., Davis M.E., Tironi I.G., van Gunsteren W.F., *Mol. Sim.*, **1994**, 14, 11-20.
- ⁵⁵ Smith P.E., Pettitt B.M., *J. Chem. Phys.*, **1991**, 95, 8430-8440.
- ⁵⁶ Powell M.J.D., *Mathematical Programming*, **1977**, 12, 241-254.

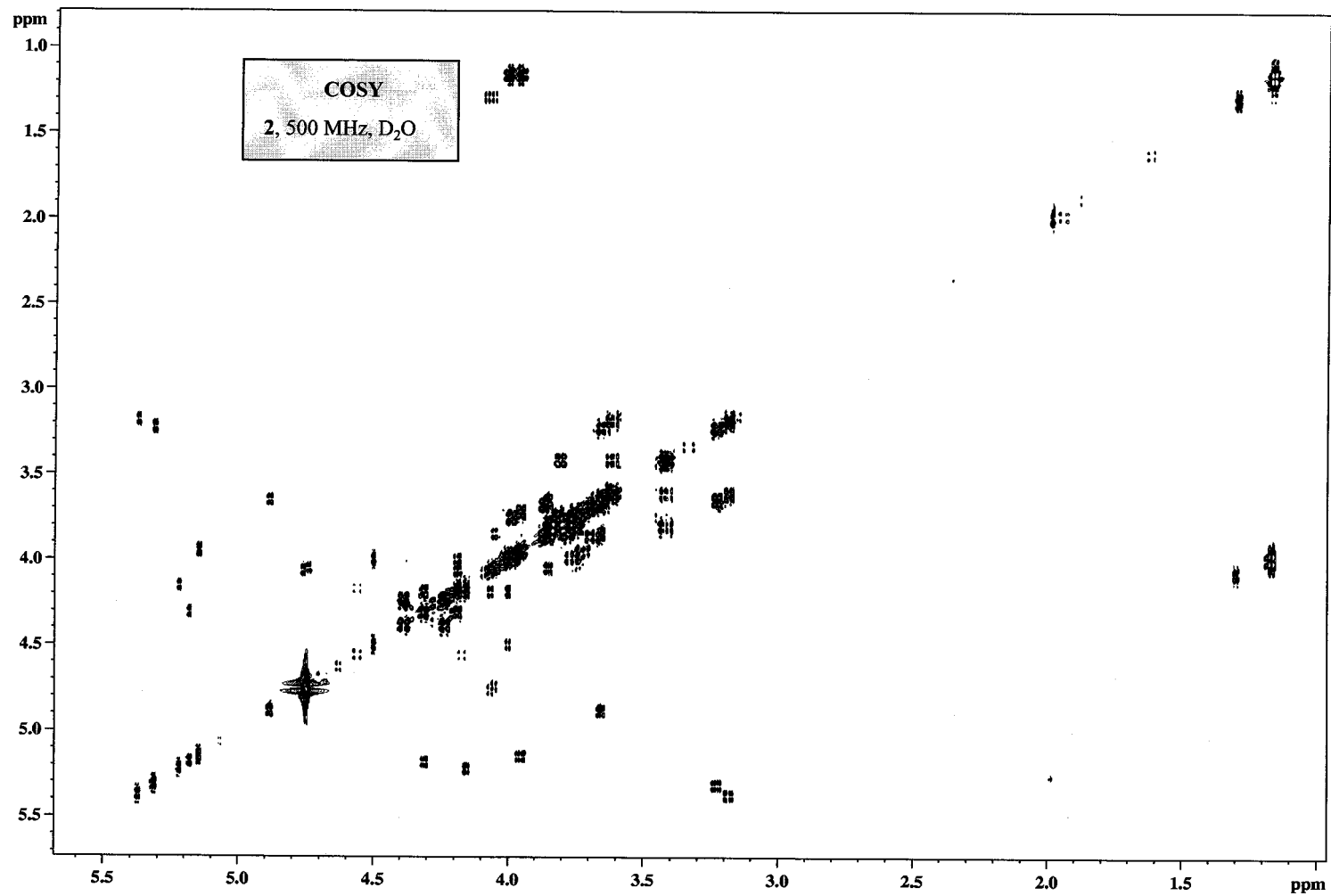
ANEXO

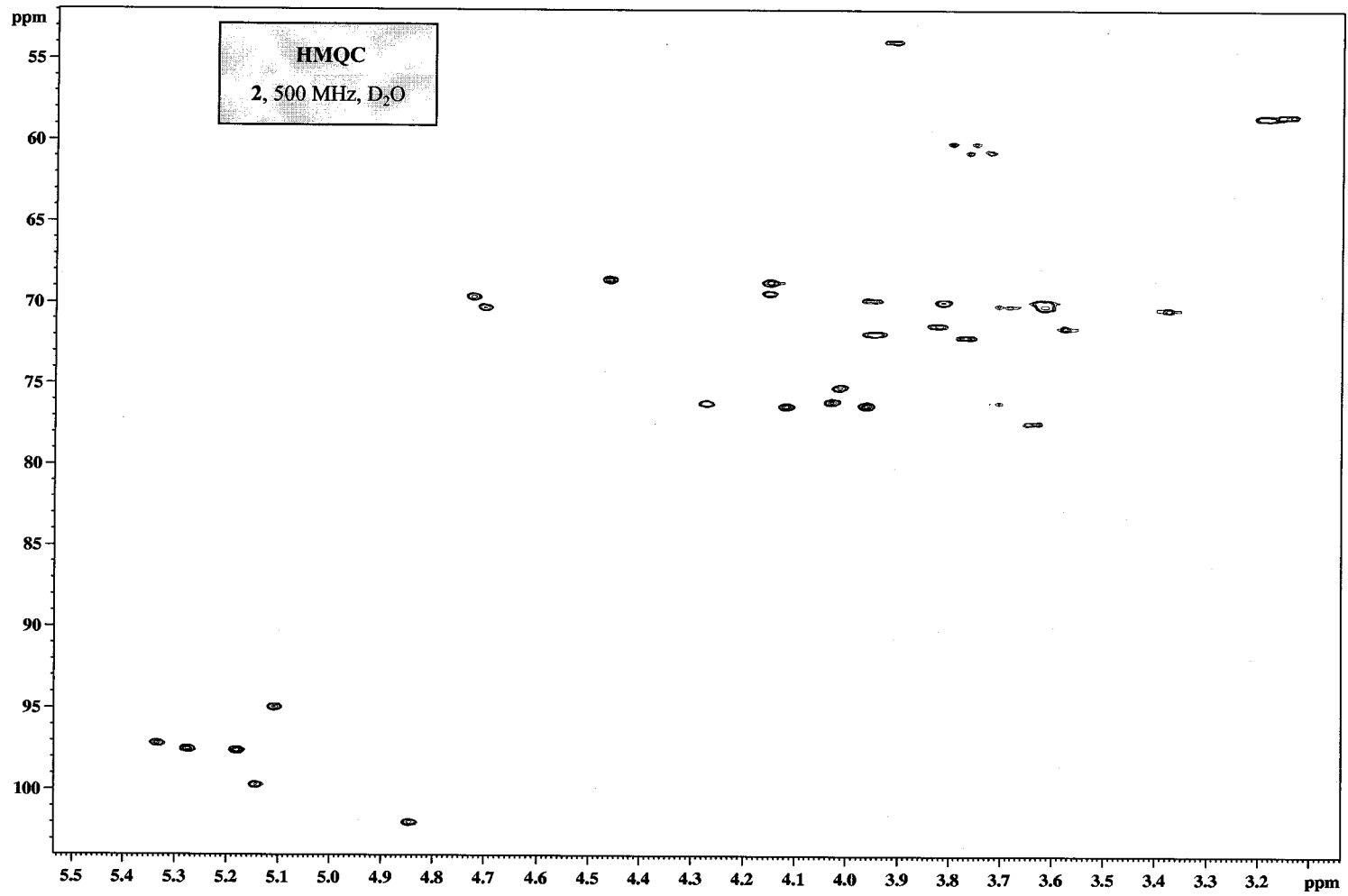
ESPECTROS

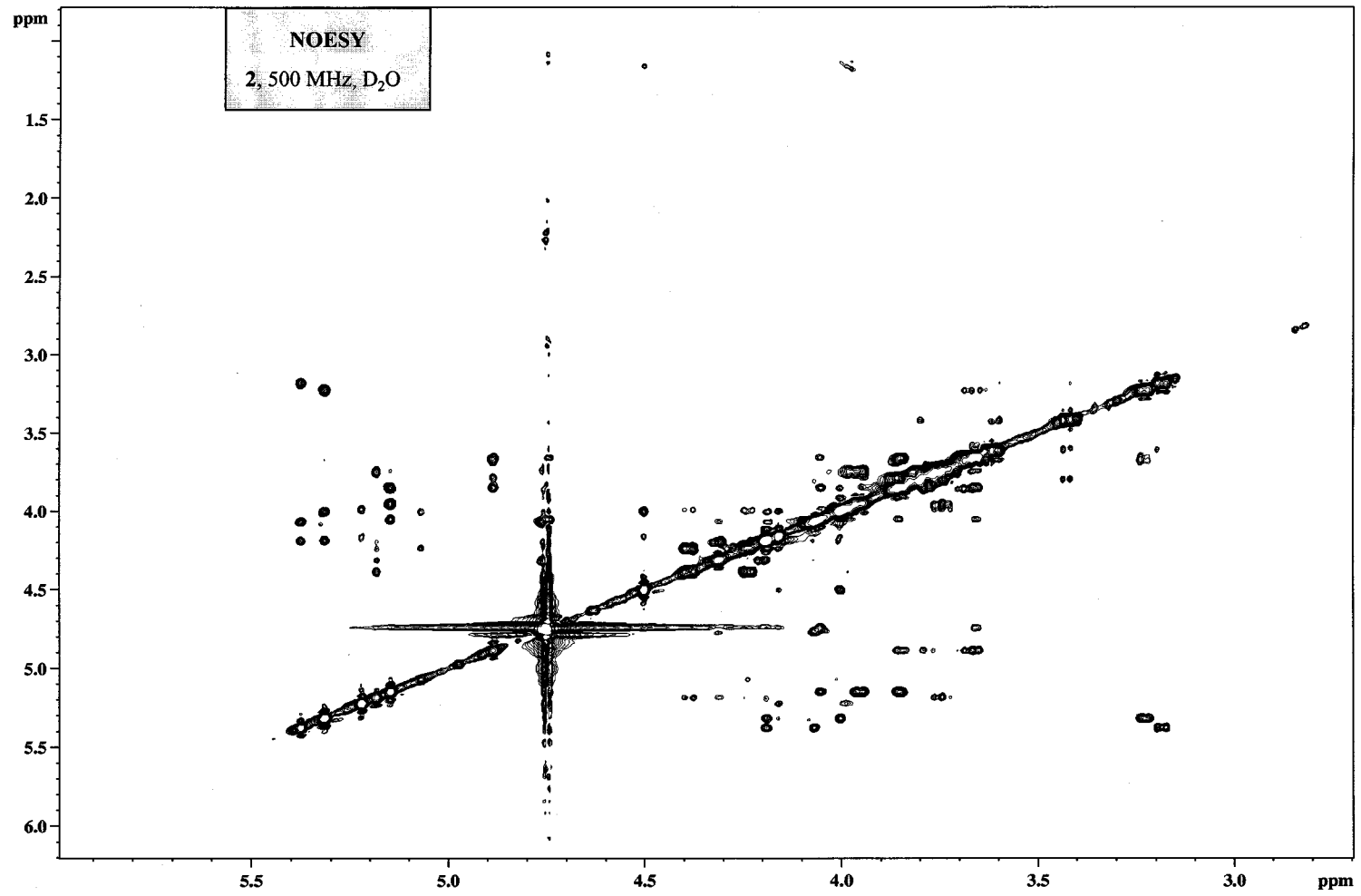


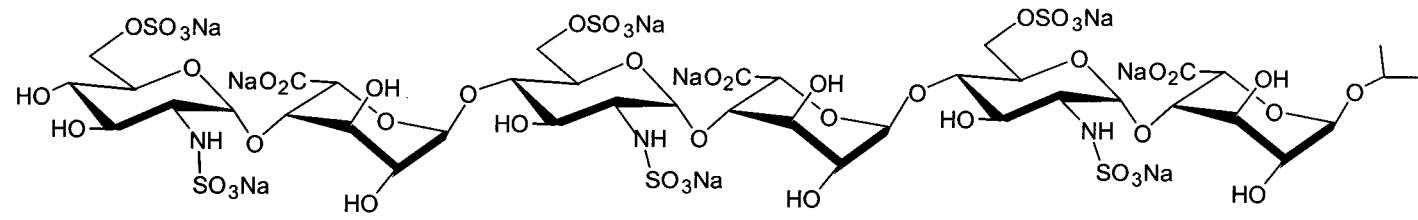




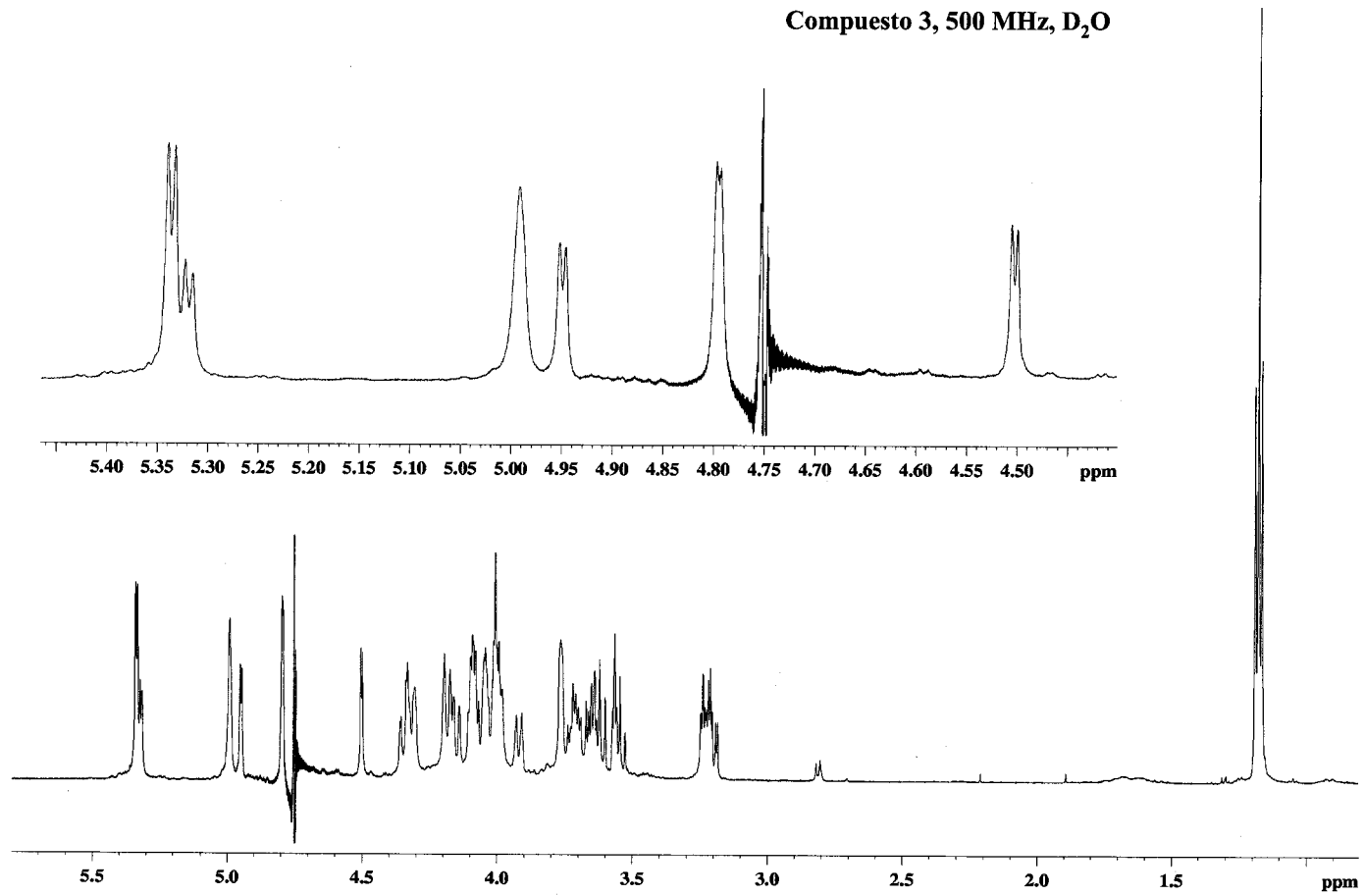


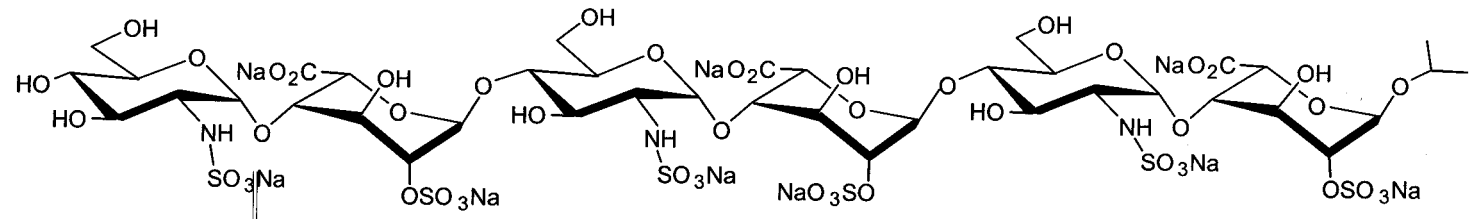




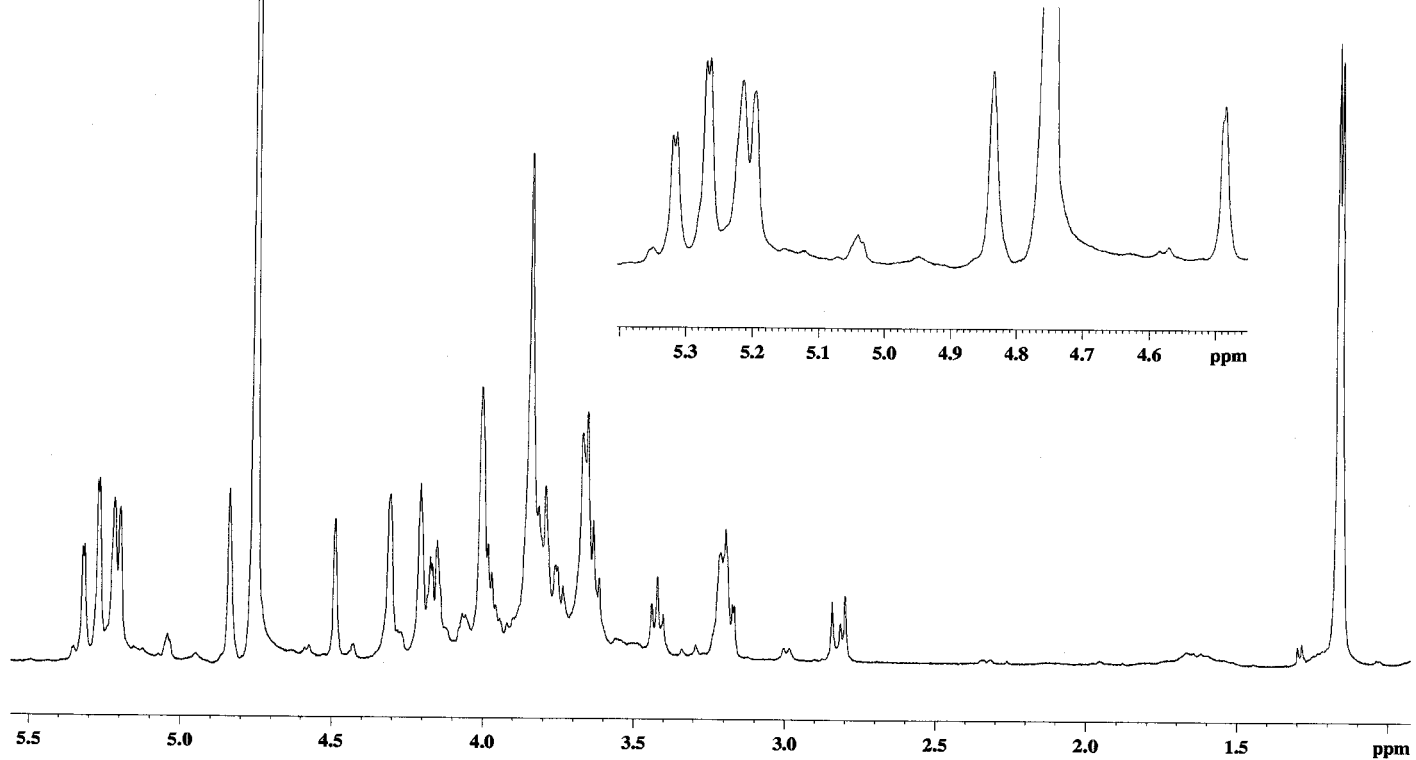


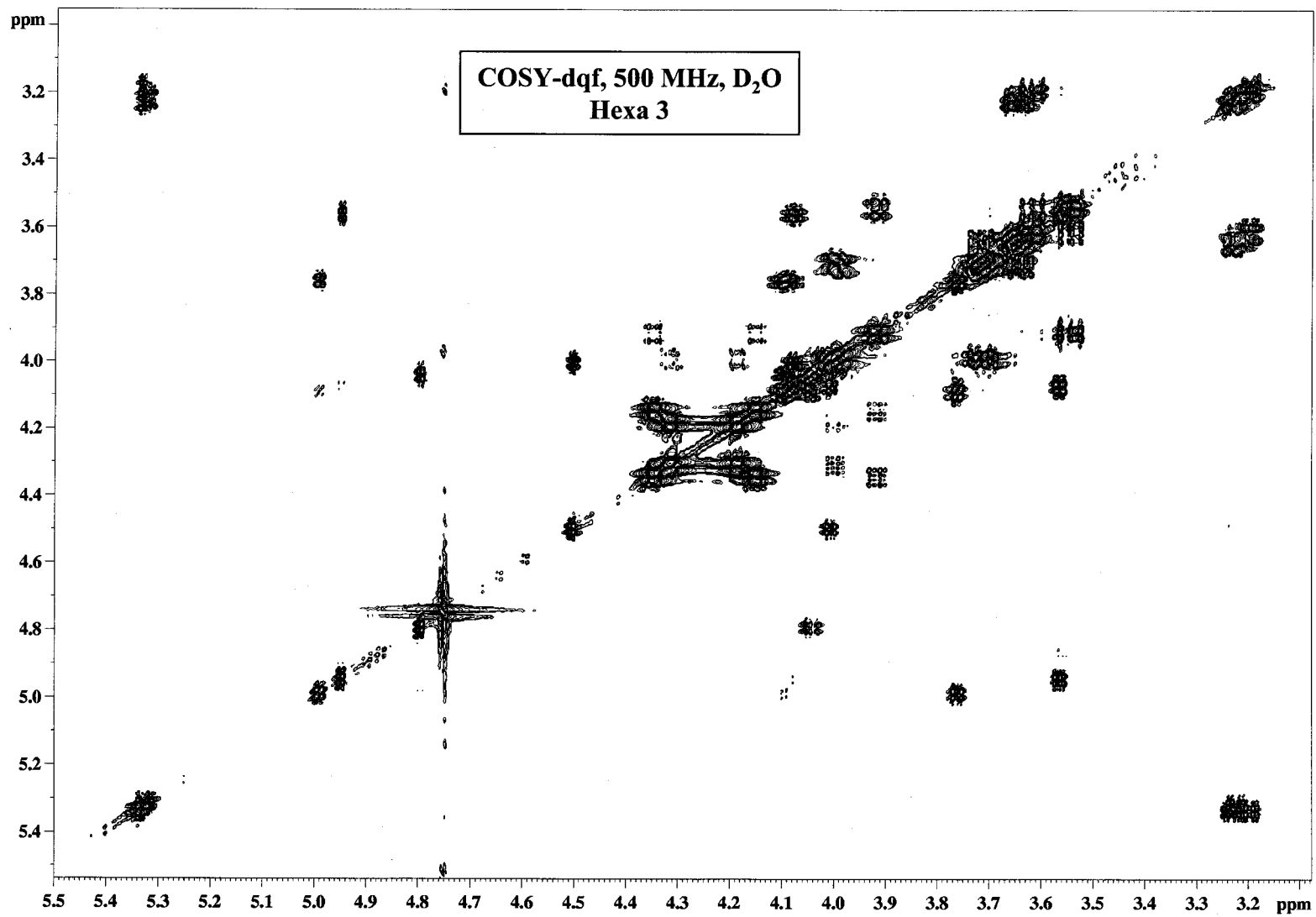
Compuesto 3, 500 MHz, D₂O

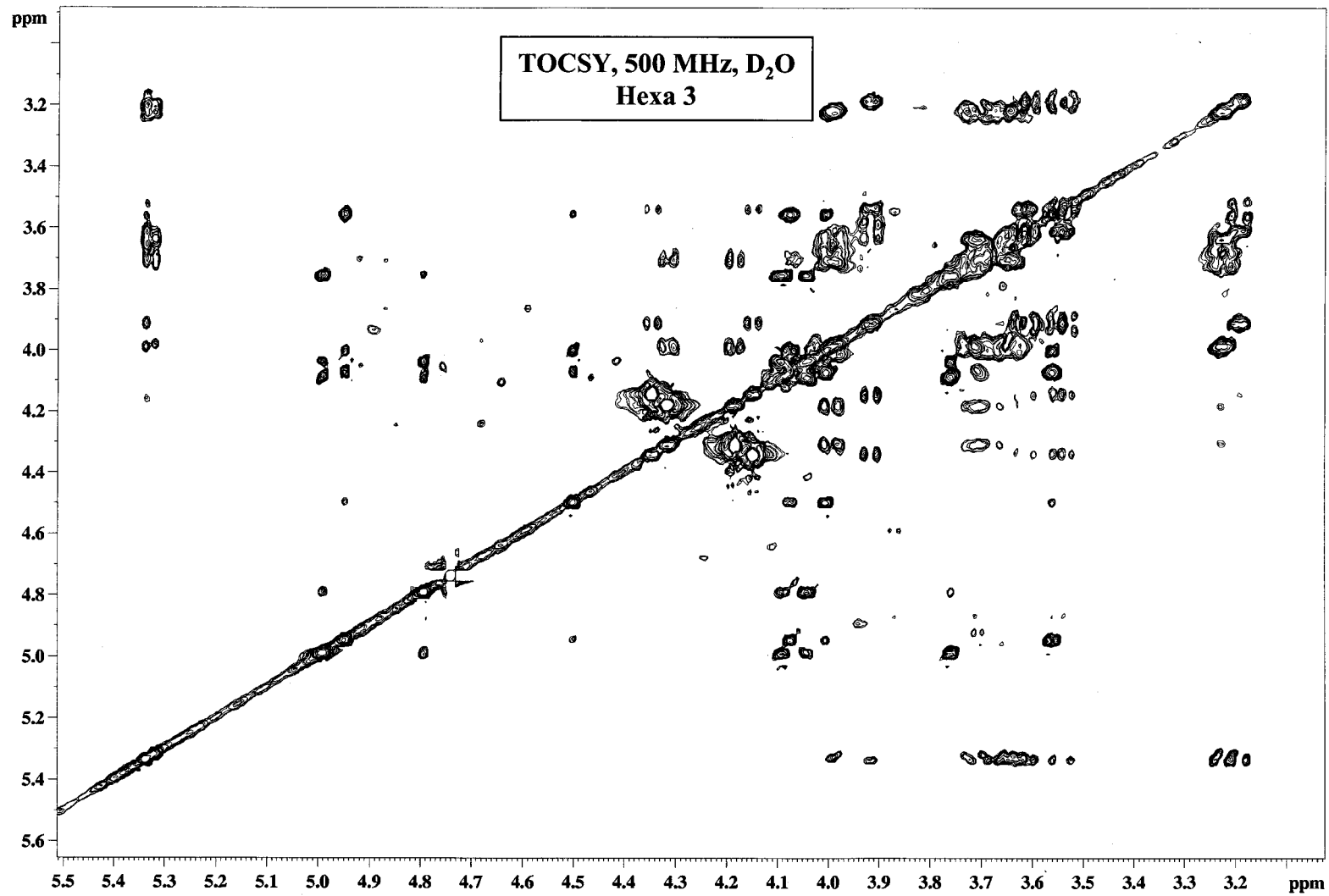


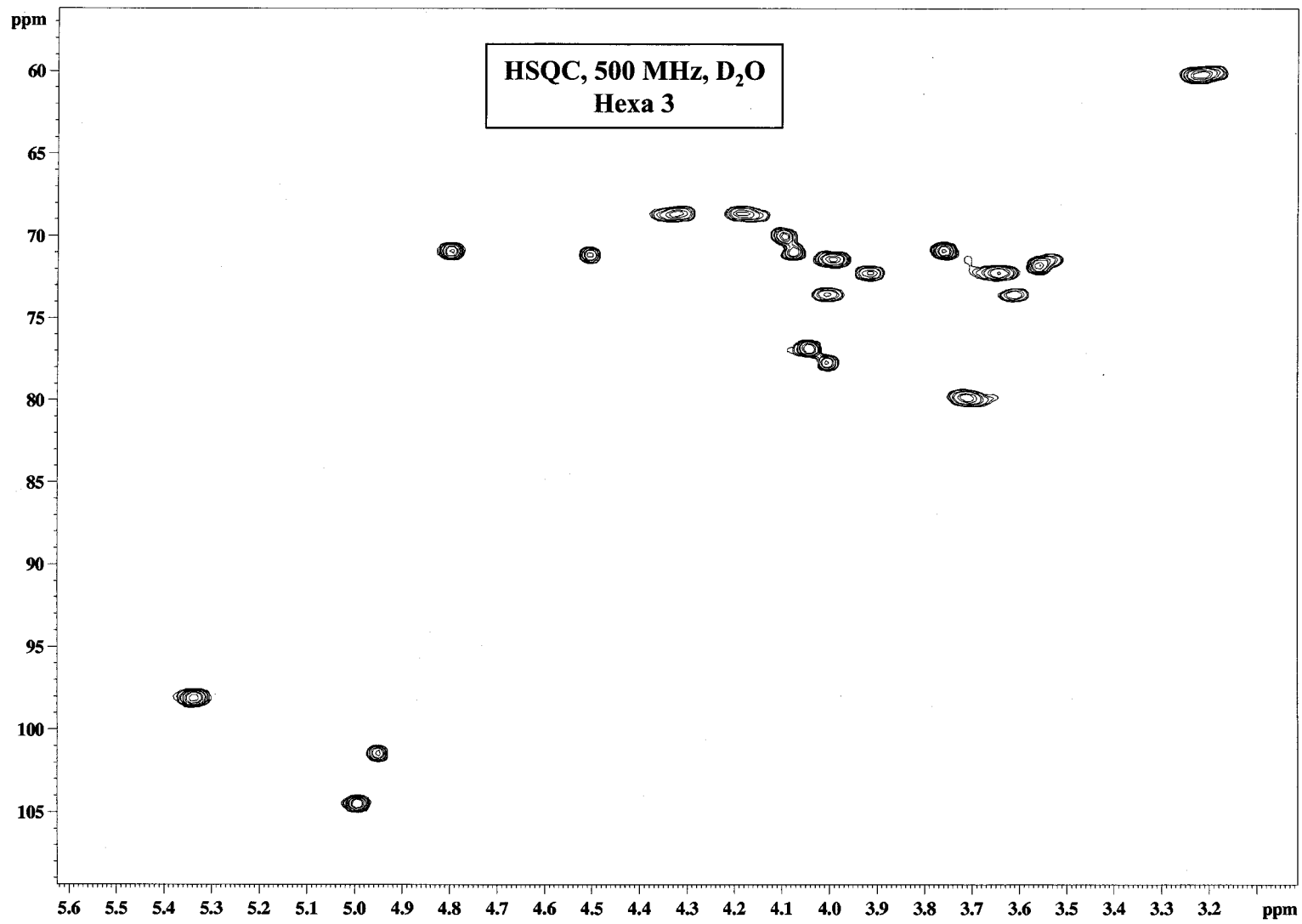


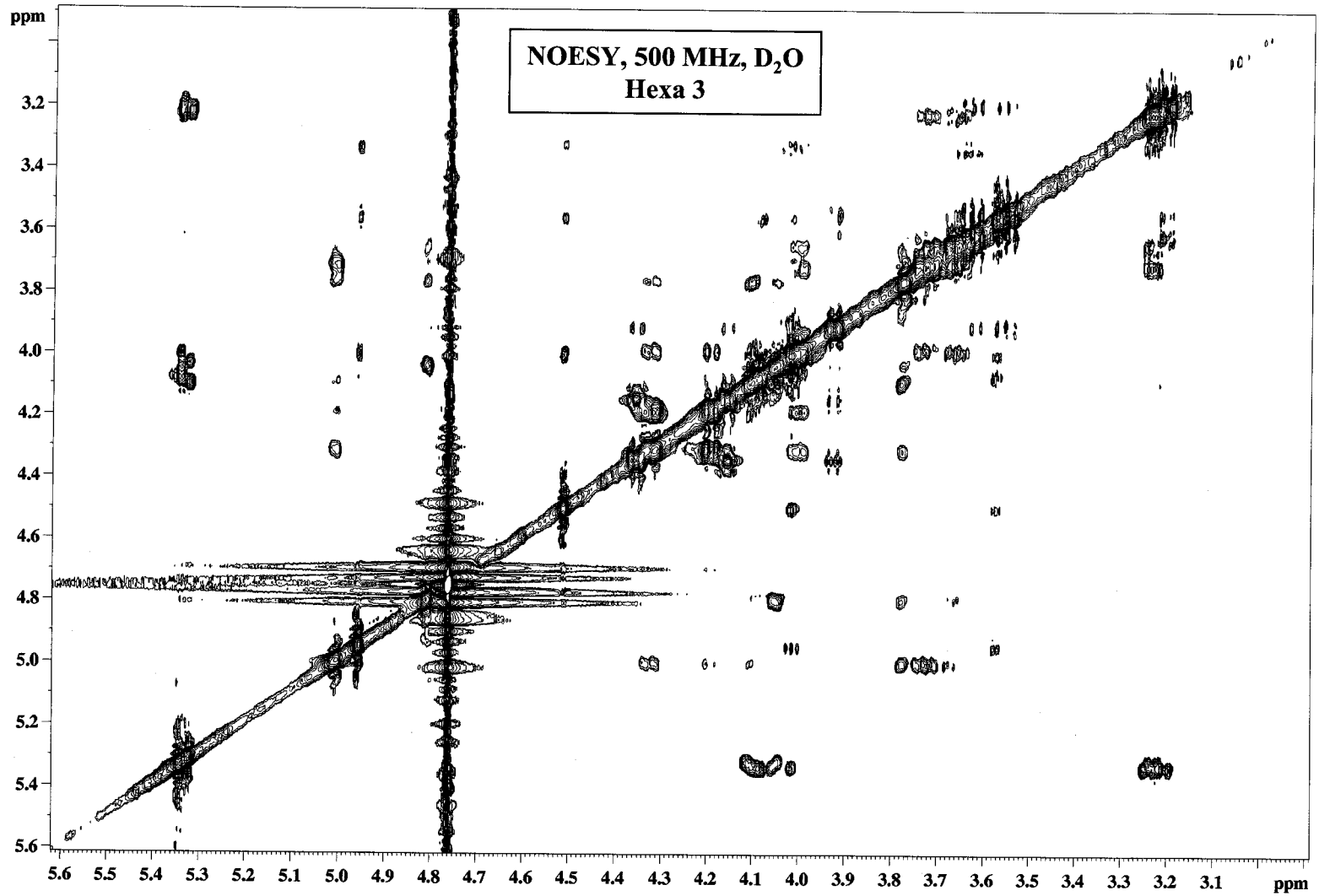
Compuesto 4, 500 MHz, D₂O

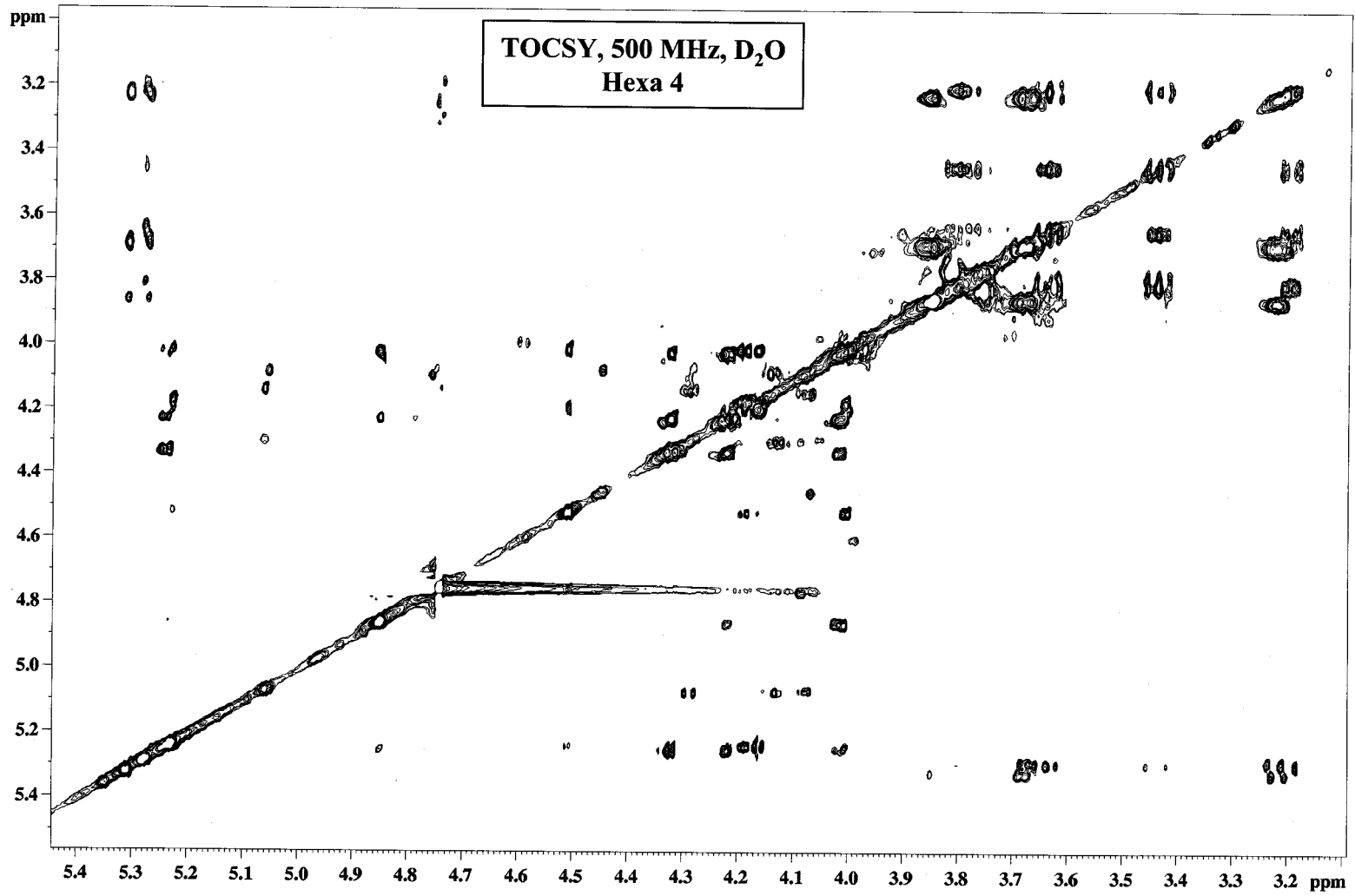


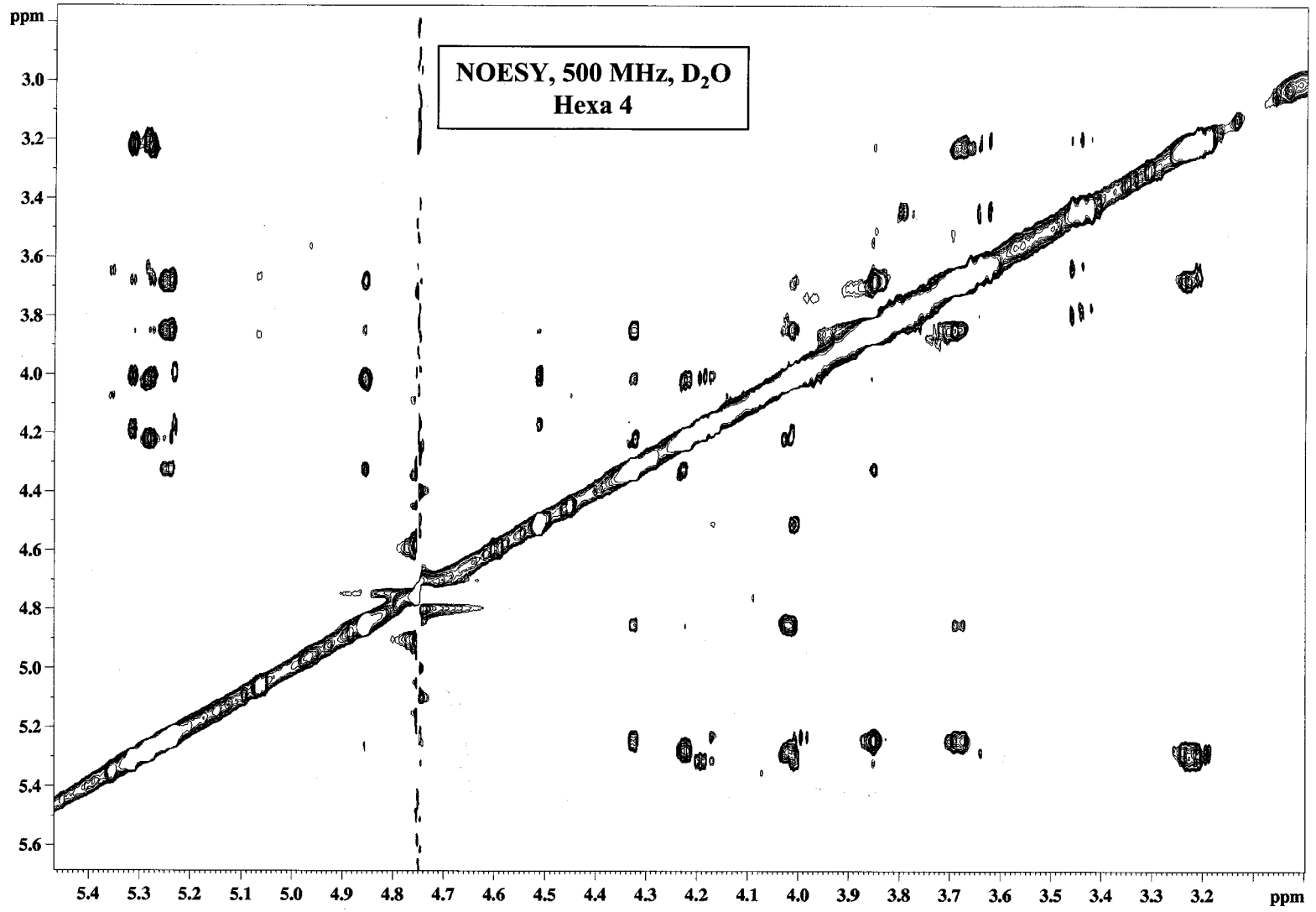












UNIVERSIDAD DE SEVILLA

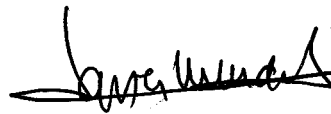
Reunido el Tribunal integrado por los señores firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Jesús Ángel Álvarez defendida F. Torres de la Biblioteca Teológica y de la Deberencia de Cigarras de M. de la floración y el modo de M. de la floración de M. de la acordó otorgarle la calificación de sobresiente cum laude por unanimidad (5 votos)

Sevilla, 14 de octubre 2002

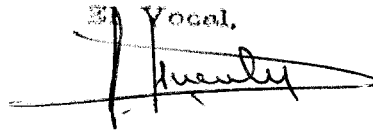
El Vocal,



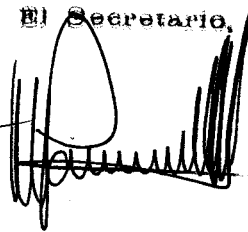
EL PRESIDENTE



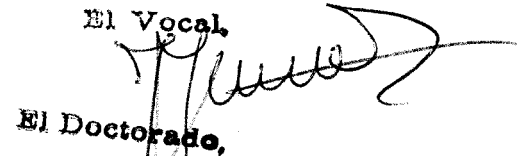
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

