

RMN: Aplicaciones en procesos de reconocimiento molecular y análisis conformacional

Trabajo Fin de Máster

Máster en Química Sintética e Industrial



Autor:

Cristian García Sepúlveda

Directores:

Jesús Jiménez-Barbero

Ana Ardá Freire

El Trabajo Fin de Estudios titulado:

Master amaierako lan hau:

RMN: aplicaciones en procesos de reconocimiento molecular y análisis conformacional

Presentado por:

Nork aurkeztua:

Cristian Andrés García Sepúlveda

Para optar al Master en:

Master hau eskuratzeko:

Química Sintética e industrial

Ha sido realizado en el Centro de
investigación CICbioGUNE, en el
Departamento de:

Nafarroako Unibertsitate Publikoko
Nekazaritza Ingeniaritzako eta
Biozientzietako Goi Mailako
Eskola Teknikoko sail honetan:

Chemical Glycobiology

Bajo la dirección del Dr./Dra.

Noren zuzendaritzapean:

Ana Ardá Freire y Jesús Jiménez-Barbero

En Pamplona, el día:

Iruñean, egun honetan:

12 de Septiembre de 2023

Fdo./Stua.:

Fdo./Stua.:

Estudiante / ikaslea

Director/a / zuzendaria

Índice

1. Resumen/Abstract	1
2. Abreviaturas	3
3. Introducción	
3.1. Librerías combinatorias dinámicas dirigidas a proteínas (Proyecto 1)	4
3.2. Lisozima y sistema biológicos (Proyecto 1)	6
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> : polisacáridos capsulares (Proyecto 2)	7
3.4. Estructura y conformación de carbohidratos (Proyecto 2)	8
4. Métodos	
4.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	13
4.2. RMN: Aplicación al reconocimiento molecular (Proyecto 1)	15
4.3. RMN: Aplicación al estudio conformacional de carbohidratos (Proyecto 2)	17
4.4. Métodos computacionales	19
5. Proyecto 1: Estudio de las interacciones entre la lisozima y una librería de compuestos.	
5.1. Objetivos	21
5.2. Procedimiento experimental	21
5.3. Resultados y discusión	22
5.4. Conclusiones	31
6. Proyecto 2: <i>Staphylococcus aureus</i> : Estudio conformacional de polisacáridos capsulares sintéticos	
6.1. Objetivos	32
6.2. Procedimiento experimental	32
6.3. Resultados y discusión	32
6.4. Conclusiones	40
7. Bibliografía.	41
8. Anexos.	44

En primer lugar, he de agradecer a mis directores Ana Ardá y Jesús Jiménez-Barbero, no solo por brindarme la oportunidad de realizar mi TFM en vuestro grupo, sino también por plantearme nuevos retos e inquietudes, gracias a los cuales no solo soy un mejor científico, sino también una mejor persona. No podría olvidarme de Luca Unione, que, aunque no sea mi director, ha actuado como si lo fuese, gracias por tu paciencia y por esas charlas fraternales en aquellos momentos donde más lo necesitaba.

Marcos, Sara, Antonio y Unai, me alegra mucho haber conocido personas tan maravillosas como vosotros. Gracias por ser fuente de consejo y desahogo, por todo lo vivido y compartido. A todos los miembros del Chemical Glycobiology Lab, a mis amigos y compañeros de laboratorio, gracias por ayudarme a mejorar en cada etapa de este camino, me siento afortunado de haber tenido la suerte de iniciarme en la investigación a vuestro lado.

Al profesor Jesús María García de la UPNA, por estar siempre disponible y animarme en aquellos momentos de flaqueza, A los profesores Concepción Alonso y Endika Martín por permitirme realizar una estancia corta en vuestro laboratorio en Vitoria, aprendí y disfruté como nunca con vuestro grupo. También agradecer a nuestros colaboradores, los grupos de la Dra. Ruth Pérez-Fernández y al Profesor Jeroen Codee, gracias a vuestros avances se han podido llevar a cabo estos proyectos.

A mis padres y hermanos, por vuestro amor y cariño. A mis incondicionales Rocío, Marcos, Andy y Diego, gracias por apoyarme y brindarme vuestro apoyo en cada etapa de este viaje.

Finalmente, no podría olvidar a la plantilla de Saoco Salsoteca. Gracias a Rocío y Gaspar, por nuestras charlas filosóficas sobre música latina, así como por aquellos domingos mágicos que tanto hemos disfrutado. Mención especial para Sharon, gracias por hacerme reír "como si no odiase la vida", sin ti esto no hubiese sido posible.

*“ Y recuerda, el que a buen árbol se arrima,
buena sombra lo cobija ”*

1. Resumen

Esta memoria de Trabajo de Fin de Máster consta de dos partes bien diferenciadas, que se corresponden con los dos trabajos de investigación llevados a cabo en el laboratorio de Chemical Glycobiology de CIC bioGUNE. Ambos proyectos tienen en común el empleo de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para obtener información, a nivel estructural atómico, de diferentes sistemas químicos de relevancia biológica.

Proyecto 1. La química combinatoria dinámica dirigida por una proteína (*Protein-directed dynamic combinatorial Chemistry*, P-D DCC) es una herramienta poderosa para la identificación de ligandos que actúen sobre proteínas farmacológicamente relevantes. El potencial de esta técnica reside en la síntesis y selección *in-situ* de un determinado ligando, en presencia de una proteína objetivo. Así, múltiples fragmentos químicos reaccionan entre sí de forma reversible en presencia de la proteína, generando una librería de potenciales ligandos. El fenómeno de reconocimiento molecular en estas condiciones está bajo control termodinámico, de tal manera que el equilibrio químico resultante estará desplazado hacia el ligando que forme un complejo ligando-proteína más estable. De esta manera, la composición de la librería se desplaza hacia el/los ligando/s de mayor afinidad por la proteína a expensas de otros. Tras alcanzar el equilibrio, el análisis correspondiente, revelará estos ligandos con mayor afinidad, ya que mostrarán unas señales amplificadas en comparación con aquellos ligandos de menor afinidad. Nuestros colaboradores del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC) en Madrid, dirigido por la Dra. Ruth Pérez-Fernández, aplicaron esta metodología para la identificación de acilhidrazonas como ligandos de la enzima lisozima de la clara de huevo (HEWL), a partir de una librería de fragmentos compuesta por 4-formil-3-metoxibenzonitrilo y una serie de hidrazidas. Los resultados del grupo de la Dra. Pérez-Fernández, mostraron la clara amplificación de una de las acilhidrazonas en presencia de la lisozima. Estos resultados han dado pie al primero de los trabajos de investigación que se presenta en esta memoria, cuyo objetivo ha sido la determinación de las bases estructurales de la amplificación de la citada acilhidrazona en presencia de lisozima. Para ello, se llevó a cabo un estudio de reconocimiento molecular basado en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) entre la lisozima y diferentes componentes de la librería dinámica combinatoria. Primeramente, se asignaron los espectros RMN de la proteína objetivo, para posteriormente estudiar la perturbación del desplazamiento químico en presencia de diferentes elementos de la librería. Además, se usó la estrategia de Diferencia de Transferencia de Saturación (*Saturation Transfer Difference*, STD-NMR), que permite caracterizar el fenómeno de reconocimiento molecular también desde el punto de vista del ligando. La información obtenida de estos experimentos, en combinación con procedimientos de docking molecular, permitió proponer la estructura tridimensional del complejo Lisozima-acilhidrazona, y deducir así las bases estructurales de la selección molecular.

Proyecto 2. *Staphylococcus aureus* es una bacteria Grampositiva, asociada con una gran variedad de infecciones que pueden derivar en diferentes enfermedades como artritis séptica y neumonía. La pared celular de *S. Aureus* está cubierta por polisacáridos capsulares (CP), que están unidos covalentemente al peptidoglicano. Los CPs representan la primera línea de defensa para la bacteria. Uno de los CPs más abundante de *S. Aureus* es CP8, cuya unidad de repetición es el trisacárido $\rightarrow 3$ - β -D-ManNAc(4OAc)-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-FucNAc-(1 \rightarrow). Las funciones biológicas de los glicanos están íntimamente relacionadas con su estructura y conformación. Así, en este segundo proyecto de investigación, se llevó a cabo el análisis conformacional de dos oligosacáridos de CP8 con una y tres unidades de repetición (es decir un trisacárido y un nonasacárido). Estos oligosacáridos han sido obtenidos en forma pura mediante síntesis química en el laboratorio del Prof. Dr. Jeroen Codee de la Universidad de Leiden. Para ello, se adquirieron diferentes experimentos de RMN a alto campo (800 MHz), que tras su análisis e integración con protocolos de modelado molecular permitieron deducir las preferencias conformacionales de estos oligosacáridos en disolución.

Abstract

This master's thesis report consists of two distinct parts, which correspond to the two research projects carried out in the CICbioGUNE Chemical Glycobiology laboratory. Both projects have in common the use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) to obtain information, at the atomic level, of different chemical systems of biological relevance.

Project 1. Protein-directed dynamic combinatorial chemistry (P-D DCC) is a powerful tool for the identification of ligands that act on pharmacologically relevant proteins. The potential of this technique lies in the in-situ synthesis and selection of a certain ligand, in the presence of a target protein. Thus, multiple chemical fragments react with each other reversibly in the presence of the protein, generating a library of potential ligands. The molecular recognition process in this situation is under thermodynamic control, in such a way that the resulting chemical equilibrium will be shifted towards the product that forms the more stable ligand-protein complex. In this way, the composition of the library shifts towards the ligand(s) with the highest affinity for the protein at the expense of others. After reaching equilibrium, the corresponding analysis will reveal these ligands with higher affinity, since they will show amplified signals compared to those ligands with lower affinity. Our collaborators at the Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC) in Madrid, directed by Dr. Ruth Pérez-Fernández, applied this methodology for the identification of acylhydrazones as ligands of the egg white lysozyme enzyme (HEWL), from a library of fragments composed of 4-Formyl-3-methoxybenzotrile and a series of hydrazides. The results of Dr. Pérez-Fernández's group showed the clear amplification of one of the acylhydrazones in the presence of lysozyme. These results have given rise to the first research project presented in this report, whose objective has been the determination of the structural bases of the amplification of the aforementioned acylhydrazone in the presence of lysozyme. For this, a molecular recognition study based on Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was carried out between lysozyme and different components of the dynamic combinatorial library. First, the NMR spectra of the target protein were assigned to later study the perturbation of the chemical shift in the presence of different elements of the library. In addition, the Saturation Transfer Difference (STD-NMR) strategy was used, which allows characterizing the molecular recognition phenomenon also from the ligand point of view. The information obtained from these experiments, in combination with molecular docking procedures, allowed to propose the three-dimensional structure of the Lysozyme-acylhydrazone complex, and thus deduce the structural bases of molecular selection.

Project 2. *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterium, associated with a wide variety of infections that can lead to different diseases such as septic arthritis and pneumonia. The cell wall of *S. aureus* is covered by capsular polysaccharides (CP), which are covalently linked to peptidoglycan. CPs represent the first line of defense for the bacteria. One of the most abundant CPs of *S. aureus* is CP8, whose repeating unit is the trisaccharide $\rightarrow 3) \text{-}\beta\text{-D-ManNAcA(4OAc)-(1}\rightarrow 3) \text{-}\alpha\text{-L-FucNAc-(1}\rightarrow 3) \text{-}\alpha\text{-D-FucNAc-(1}\rightarrow$. The biological functions of glycans are closely related to their structure and conformation. Thus, in this second research project, the conformational analysis of two CP8 oligosaccharides with one and three repeating units (i.e., a trisaccharide and a nonasaccharide) was carried out. These oligosaccharides have been obtained in pure form by chemical synthesis in the laboratory of Prof. Dr. Jeroen Codée of the University of Leiden. For this, different NMR experiments were acquired at high field (800 MHz), which after the corresponding analysis and integration with molecular modeling protocols, allowed us to deduce the conformational preferences of these oligosaccharides in solution.

2. Abreviaturas.

Ala: L-Alanina

Arg: L-Arginina

AM1: Austin Model 1

B3LYP: Funcional de correlación de intercambio híbrido con tres parámetros de Becke y Lee-Yang-Parr

COSY: Espectroscopia de Correlación dinuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$

CP: Polisacáridos Capsulares

CP5: Polisacáridos Capsular 5

CP8: Polisacáridos Capsular 8

CSP: Perturbación del Desplazamiento Químico

D-Fuc: D- Fucosa

DCC: Química Combinatoria Dinámica

DCL: Librerías Combinatorias Dinámicas

FID: Decaimiento por inducción libre

FT: Transformada de Fourier

Gal: Galactosa

Glc: Glucosa

Gln: L-Glutamina

Glu: Ácido L-Glutámico

HEWL: Lisozima de la clara de huevo de gallina.

HLPC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

^1H - ^{13}C -HSQC: Coherencia Heteronuclear Cuántica Simple

Ile: L-Isoleucina.

LTA: Ácido lipoteicoico.

Leu: L-Leucina

LYS: Lisozima

L-Fuc: L-Fucosa

ManA: Ácido Manurónico.

MM: Mecánica molecular.

MD: Dinámica Molecular

MNDO: Modified Neglect of Differential Overlap

MS: Espectrometría de Masas

ms: milisegundos

NAG: N-AcetilGlucosamina

NAM: Ácido N-AcetilMurámico

NOE: Efecto Overhauser Nuclear

NOESY: Espectroscopia NOE

Ns: Número de scans

P-DCC: Química Combinatoria Dinámica dirigida por Proteínas

PBS: Tampón Fosfato Salino

PDB: Banco de Datos de Proteínas

QM: Mecánica cuántica.

ROESY: Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy

Ser: L-Serina

STD: Diferencia de Transferencia de Saturación

TOCSY: Espectroscopia de Correlación Total.

Trp: L-Triptofano

WTA: Ácido teicoico unido a peptidoglicano de la pared celular.

3.1. Librerías combinatorias dinámicas. (Proyecto 1) ^{[1][2][3]}

La química combinatoria dinámica es una herramienta que consiste en la generación de nuevas moléculas mediante la reacción reversible entre diferentes fragmentos químicos simples bajo control termodinámico. Una de las variantes de esta estrategia es la química combinatoria dinámica ayudada o dirigida por proteínas (P-D DCC, de sus siglas en inglés), la cual permite identificar ligandos farmacológicamente activos frente a una proteína objetivo. ^[4]

El gran potencial de esta técnica consiste en la síntesis y selección *in situ* de los ligandos que presenten mayor actividad frente a la proteína objetivo, evitando en el proceso largas etapas de síntesis y purificación de aquellos análogos que presenten menor afinidad.



Figura 3.1. Librerías combinatorias dinámicas dirigidas por proteínas. ^[1]

En las P-D DCC el proceso de reconocimiento molecular está bajo control termodinámico, es decir, el equilibrio químico estará desplazado hacia el complejo proteína-ligando más estable energéticamente. De esta manera, el producto químico que sea el ligando más afín a la proteína diana estará amplificado a expensas de los otros productos posibles de la reacción entre los diferentes fragmentos. (Figura 3.1)

Las reacciones implicadas en una P-D DCC han de cumplir las siguientes características: (1) han de ser reversibles, (2) han de ser compatibles con las condiciones experimentales requeridas por la proteína diana, (3) no deben de interferir en las interacciones no covalentes implicadas en el reconocimiento molecular y (4) los fragmentos deben de ser lo suficientemente solubles en las condiciones requeridas.

El grupo de la Dra. Pérez-Fernández ha propuesto una librería dinámica combinatoria (DCL) basada en la reacción entre un aldehído y una hidrazida (Figura 3.2) para generar una librería de hidrazonas como ligandos de una proteína objetivo. La diversidad estructural proviene del grupo R de la hidrazida (fragmentos H2-H45, Figura 3.3), mientras que el aldehído se trata del formil-3-metoxibenzonitrilo (A17). Esta reacción reversible transcurre en condiciones compatibles con las necesarias para trabajar con la proteína diana en disolución (medio acuoso, temperatura ambiente y pH 6.3), que en este caso se trata de la enzima lisozima de la clara de huevo de gallina (*Hen Egg-White Lysozyme*, HEWL).



Figura 3.2. Reacción química en la que se basa la DCL propuesta.

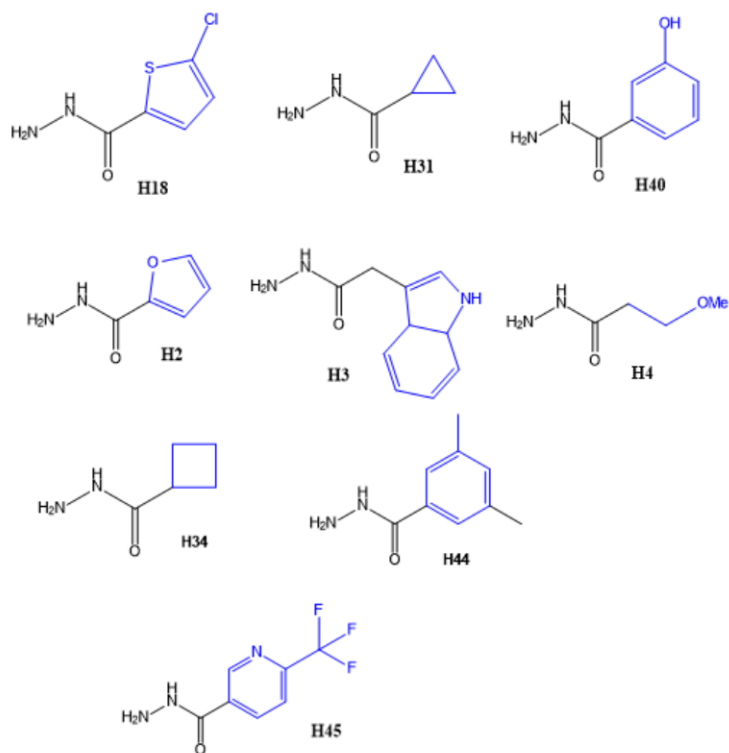


Figura 3.3. Estructuras de las hidrazidas utilizadas en la DLC.

En el grupo de la Dra. Pérez-Fernández se generó la arriba mencionada DCL en las mismas condiciones en (i) ausencia y en (ii) presencia de la HEWL. Tras alcanzar el equilibrio, se determinó la cantidad de cada una de las hidrazonas producto mediante HPLC-MS en ausencia (blank DCL) y en presencia (Prot DCL) de HEWL (Figura 3.4). Este análisis reveló que la acilhidrazona **A17H18** está **amplificada en presencia de HEWL**, lo que indica que es el ligando que se une con mayor afinidad a la lisozima. Estudios de inhibición enzimática han demostrado que efectivamente A17H18 es un sustrato de HEWL actuando como inhibidor competitivo.

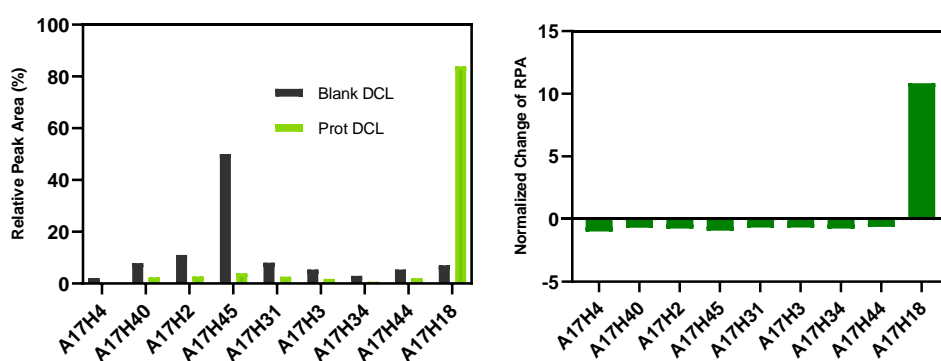


Figura 3.4. Resultados de cantidad de producto (acilhidrazonas) de la DCL determinados por HPLC-MS. A la izquierda, área del pico HPLC-MS para cada una de las acilhidrazonas en ausencia (blank DCL) y en presencia (Prot DCL) de HEWL. A la derecha, cambio normalizado de la cantidad de cada uno de los productos en ausencia *versus* presencia de HEWL. El compuesto A17H18 está claramente amplificado en presencia de HEWL.

3.2. Lisozima y sistemas biológicos. ^[5] (Proyecto 1)

La lisozima es una enzima antimicrobiana que producen los animales, formando parte de su sistema inmunitario. Se encuentra en algunas secreciones como lágrimas, saliva, leche materna y es especialmente abundante en la clara de huevo. Su función es la de catalizar la ruptura del peptidoglicano, un polímero glicosídico presente en la pared celular de las bacterias, otorgándoles resistencia osmótica y mecánica. ^[6] La lisozima de la clara de huevo de gallina (Hen Egg-White Lysozyme, HEWL) es ampliamente utilizada en la química de proteínas como proteína modelo debido a sus propiedades fisicoquímicas (estabilidad, tamaño, solubilidad etc.) y fácil accesibilidad. Con una masa molecular de 14,3 KDa, está compuesta por 129 aminoácidos y posee cuatro puentes disulfuro intramoleculares. Su punto isoeléctrico cercano a 11,3 le otorga una alta solubilidad en medios acuosos.

HEWL cataliza la ruptura del enlace β 1-4glicosídico entre el ácido N-acetil murámico (NAM) y la N-acetil glucosamina (NAG) del peptidoglicano (Figura 3.5). La actividad catalítica se debe a los residuos Glu35 y Asp52, que actúan sobre un fragmento de seis unidades de la cadena de peptidoglicano (Figura 3.5). El ácido glutámico en posición 35 actúa como dador de protones al enlace glicosídico entre los residuos 4 y 5, facilitando su ruptura. Por otra parte, el ácido aspártico en posición 52 actúa como nucleófilo dando lugar a la formación de una especie covalente glicosil-enzima. Finalmente, Glu35 ataca al intermedio glicosil-enzima, liberando los productos. ^{[7][8]}

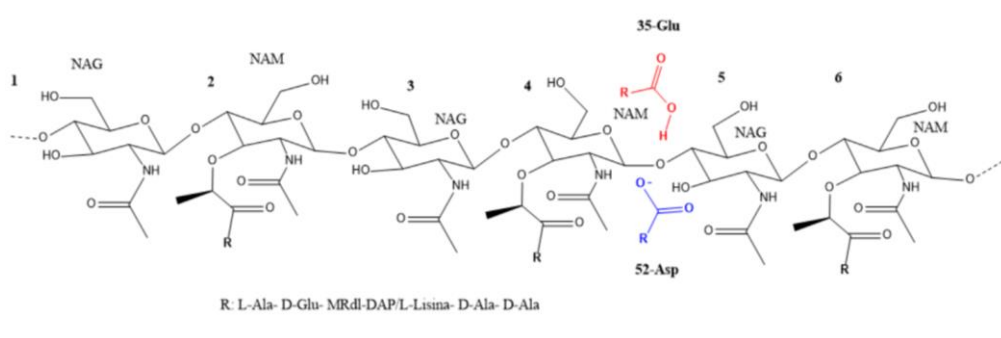


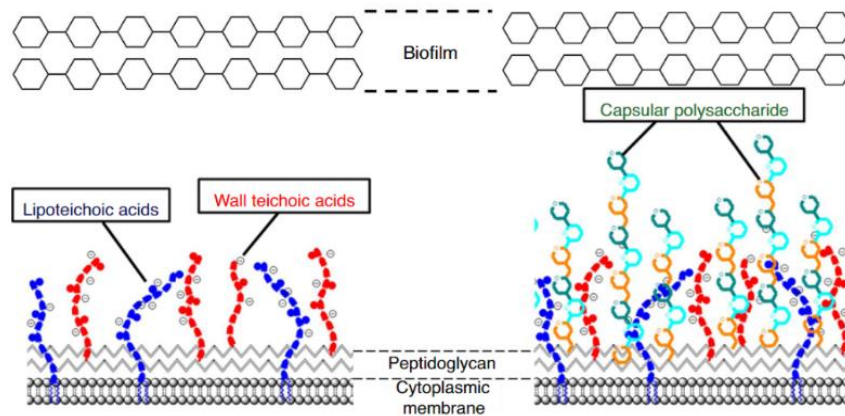
Figura 3.5. Elementos de la reacción de ruptura del peptidoglicano catalizada por la HEWL.

HEWL presenta actividad antibacteriana frente a organismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium tyrobutyricum*, entre otros. ^{[9][10]} Diferentes investigaciones han realizado modificaciones genéticas con el fin de ampliar su actividad antibacteriana, extendiéndola a otras especies como *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *E. coli*, *E. coli K12*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, entre otros. ^{[11][12]}

En el presente proyecto se ha utilizado HEWL como proteína modelo para explorar la capacidad de la DCL de generar inhibidores enzimáticos. HEWL es una proteína que ha sido ampliamente caracterizada por diferentes técnicas biofísicas, incluyendo la RMN. La asignación completa de la proteína fue publicada en 1988, ^[13] y ha servido como referencia para llevar a cabo nuestro análisis.

3.3. *Staphylococcus aureus*: polisacáridos capsulares. (Proyecto 2) ^[14] ^[15]

Staphylococcus aureus es una bacteria gram-positiva que está asociada a una amplia variedad de infecciones que pueden desembocar en diferentes enfermedades tales como neumonía o artritis séptica, entre otras. ^[16] Su pared celular está compuesta por peptidoglicano, glicopolímeros y proteínas. Muchas de estas sustancias se ven implicadas en múltiples procesos patológicos. En la figura 3.6, se muestra una representación esquemática de los diferentes componentes de la pared celular de *S. Aureus*, (1) biofilm, (2) polisacáridos capsulares, cuya estructura varía en función del tipo de cepa y pueden estar incluso ausentes (figura de la izquierda), (3) ácido teicoico (WTAs) y ácido lipoteicoico (LTA), que son



glicopolímeros aniónicos unidos covalentemente al peptidoglicano, y (4) peptidoglicano. ^[15] ^[17]

Figura 3.6. Componentes de la pared celular de *S. Aureus*. Reproducido de la referencia ^[15].

Al igual que muchas bacterias invasivas, *S. Aureus* puede producir polisacáridos capsulares (CPs) que aumentan su resistencia a diversas respuestas inmunitarias. Estos CPs son componentes clave de la pared extracelular de la bacteria y representan su primera línea de defensa. Además de proteger a la bacteria, los CPs contribuyen a su colonización y a la progresión de la enfermedad. ^[18]

Los dos CPs más abundantes en *S. Aureus* son **CP5** y **CP8**. ^[19] Las funciones biológicas de los glicanos están íntimamente relacionadas con su estructura y conformación. Así, en este proyecto se realizará el estudio conformacional de CP8, cuya unidad de repetición consiste en el trisacárido $(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-ManNAc}(4\text{OAc})\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-FucNAc}\text{-}(1\rightarrow)$. La síntesis de un trisacárido y un nonasacárido con una y tres unidades de repetición respectivamente de CP8 se llevó a cabo en la Universidad de Leiden, por el grupo del Prof. Jeroen Codeé. En la figura 3.7 se ilustran las estructuras de estos oligosacáridos a analizar.

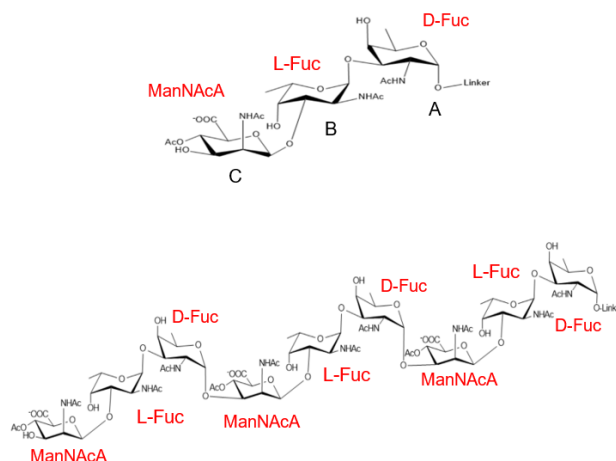


Figura 3.7. Oligosacáridos obtenidos sintéticamente, sobre los cuales se realizará el estudio conformacional.

3.4. Estructura y conformación de carbohidratos

Los carbohidratos son las biomoléculas más abundantes en la naturaleza. Éstas se encuentran en todas las células, bien sea de forma libre o unidas covalentemente con otras biomoléculas para formar glicoconjugados. ^[20] Estas moléculas cumplen un papel esencial en los sistemas biológicos, siendo clave en el desarrollo de los organismos. Asimismo, también actúan como mediadores en interacciones con patógenos, interviniendo específicamente en la unión con virus, bacterias o con otras sustancias que puedan desencadenar respuestas inmunitarias. ^[21]

Monosacáridos. Los carbohidratos están formados por monosacáridos, que pueden ser aldosas o cetosas, dependiendo de si contienen un aldehído o una cetona, respectivamente. Se clasifican además según la longitud de la cadena carbonada, pudiendo ser triosas, tetrasas, pentosas o hexosas, si tienen tres, cuatro, cinco o seis átomos de carbono, respectivamente. Todos los monosacáridos suelen nombrarse de forma abreviada, como Gal (Galactosa), Glc (Glucosa), Man (Manosa), Xyl (Xilosa) o Rib (Ribosa). Para las aldosas, el aldehído se numera como C1, mientras que, para las cetosas, la cetona recibe la numeración más baja posible (normalmente C2). En la figura 3.8, se ilustran las proyecciones de Fischer de las aldosas más representativas. Un monosacárido puede pertenecer a la serie D o L, dependiendo de la configuración del carbono quiral más lejano al carbono anomérico (aquel que contiene el carbonilo). ^[22] La nomenclatura D/L define de esta manera la configuración absoluta de un monosacárido, mientras que el nombre trivial (Glucosa, Manosa, etc.) define la configuración relativa de sus centros quirales.

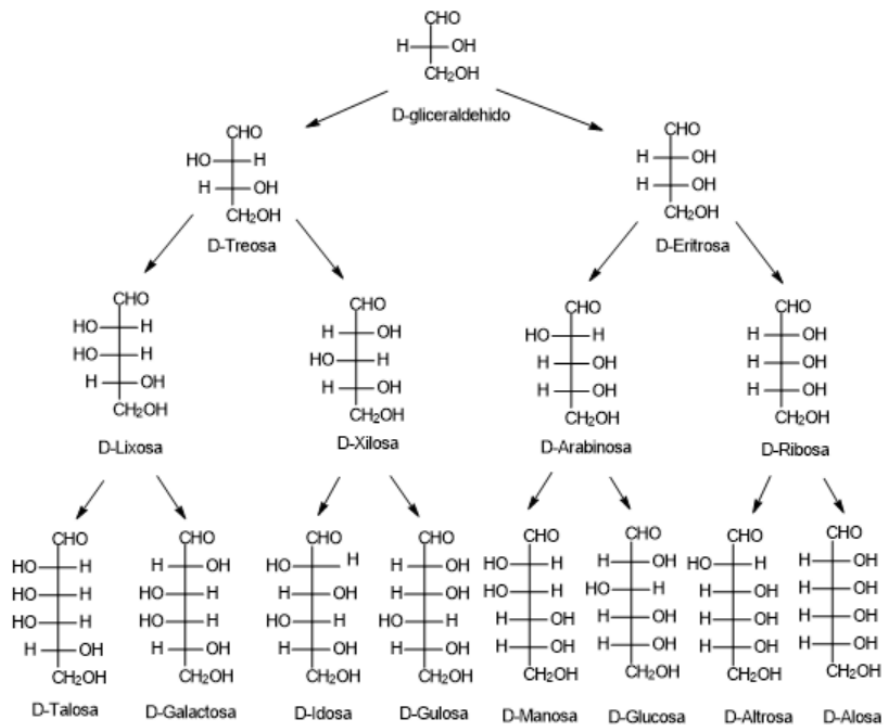


Figura 3.8. Proyección de Fischer de las aldosas más representativas.

Las aldopentosas y aldo- y ceto- hexosas existen en disolución mayoritariamente en forma cíclica. Esto sucede por el ataque nucleófilo intramolecular de uno de los grupos hidroxilos al aldehído/cetona para formar un acetal o hemiacetal cíclico dando lugar a anillos de furanosa (ciclo de cinco miembros) o piranosas (ciclo de seis miembros), que son más estables que las formas abiertas (Figura 3.9). En este proceso se genera un nuevo centro quiral, definido como carbono anomérico (C1) y que se corresponde con el carbono carbonílico de la forma abierta. Su estereoquímica se define con la nomenclatura alfa (α) y beta (β). Así, si el grupo hidroxilo se orienta en la misma dirección en la proyección de Fischer que el grupo hidroxilo del carbono de referencia (aquel que le confiere al monosacárido la configuración D o L), se tiene el anómero alfa (**I**). En caso contrario, nos referimos al anómero beta (**II**). La reacción de formación del acetal/hemiacetal es reversible, de tal manera que, en disolución acuosa, estos monosacáridos se encuentran en equilibrio químico entre la forma abierta (**III**) y la forma cíclica, muy desplazado hacia la forma cíclica. Esta reversibilidad da lugar a un proceso de interconversión entre los anómeros alfa y beta se le denomina "mutarrotación" ^[23] (Figura 3.9).

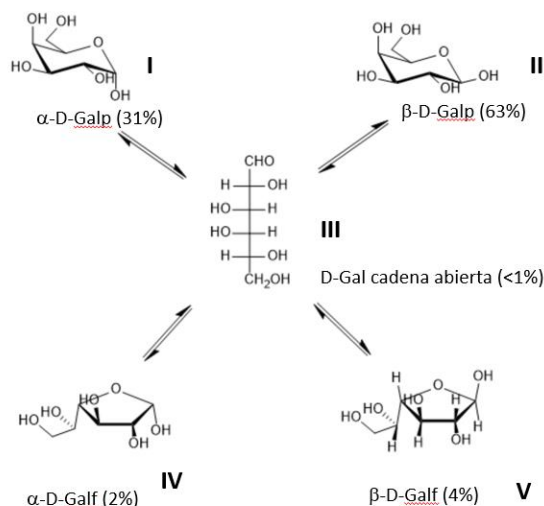


Figura 3.9. Equilibrio forma cíclica-abierta para D-Galactosa. I y II ilustran los anómeros alfa y beta respectivamente. III la forma abierta carbonilo. IV y V los anómeros alfa y beta de D-galactofuranosa respectivamente. [24][25]

El efecto anomérico. En los monosacáridos libres, el **efecto anomérico** [26] tiene una influencia importante en el equilibrio de mutarrotación, favoreciendo la posición axial para el grupo hidroxilo en la posición anomérica, a costa de la ecuatorial, que sería la preferente por razones puramente estéricas. El efecto anomérico es un efecto estereoelectrónico que tiene su origen en la deslocalización de uno de los pares de electrones libres del oxígeno endocíclico (O5) hacia la orbital sigma antienlazante del enlace C1-O1. Así, por ejemplo, para la D-Glucopiranososa, el anómero beta (OH1 en posición ecuatorial en una silla ⁴C₁) es 0,34 kcal/mol más bajo en energía que el anómero alfa (con el OH1 en posición axial en una silla ⁴C₁), debido a lo cual, el equilibrio de mutarrotación consiste en un porcentaje de anómeros alfa/beta de 36/64 respectivamente (Figura 3.10). [27]

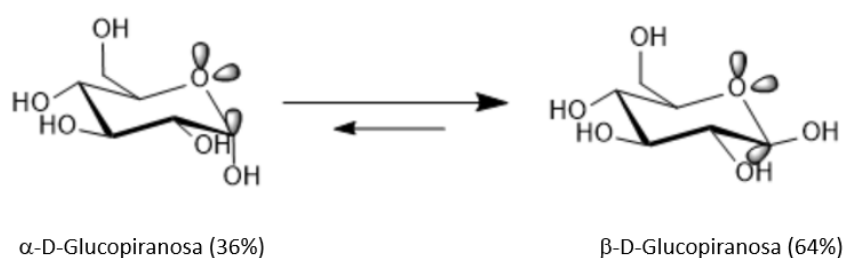


Figura 3.10. Equilibrio entre los anómeros alfa y beta en D-Glucopiranososa. En la figura se muestran los pares de electrones libres del oxígeno endocíclico (O5) así como el orbital molecular sigma antienlazante del enlace C1-O1, implicados en el efecto anomérico.

Los anillos de piranososa presentan flexibilidad conformacional, pudiendo adoptar conformaciones de tipo silla (C, de *chair*), barco (B, de *boat*), bote torcido (S, de *skew*), sobre (E, de *envelope*) o media-silla (H, de *half-seat*). Para referirse a las diferentes opciones en cada caso, se establece un plano de referencia, definido por O₅-C₂-C₃-C₅, de tal manera, que las

posiciones del anillo que queden por arriba de este plano se indicarán como superíndice a la izquierda de la letra que defina la conformación (C, B, S, E ó H), y las que quedan por debajo se indicarán con un subíndice a la derecha. Generalmente, la conformación más estable en piranosas es la silla (C), pudiendo ser esta 4C_1 y 1C_4 (VII y VIII en la Figura 3.11). La forma más estable para cada uno de los monosacáridos dependerá del tipo de sustituyentes del ciclo y sobre todo de su estereoquímica. En general, los grupos voluminosos (los grupos -OH, -CH₂OH, Me, NH₂, NHCOMe, etc) tenderán a ocupar posiciones ecuatoriales, mientras que los H ocuparán preferentemente posiciones axiales por razones estéricas. Así, por ejemplo, la conformación dominante en D-hexopiranosas suele ser la conformación en silla 4C_1 (VII), mientras que las L-hexopiranosas se suelen disponer en la conformación 1C_4 (VIII). Las otras conformaciones posibles, por ej. botes (B, IX), botes torcidos (S, X) y medias sillas (H, XI) (Figura 3.11) son menos habituales, pero pueden existir en cuando existen sustituyentes muy voluminosos, cuando se dan dobles enlaces en el anillo, o en estados de transición. [28] [29]

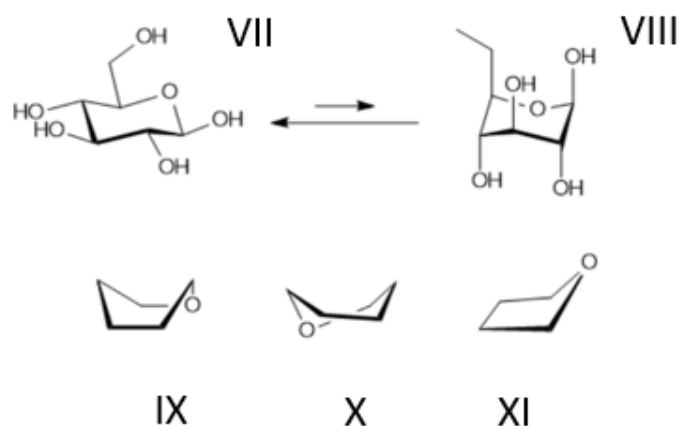


Figura 3.11. Conformaciones más habituales en las aldohexosas.

Otro grado de flexibilidad conformacional en los monosacáridos se da en torno al grupo hidroximetilo. En la figura 3.12, se describen las conformaciones alrededor del enlace C5-C6, para lo cual, se define el ángulo diedro $\omega = H_5-C_5-C_6-O_6$. Las tres conformaciones alternadas posibles se nombran en función de la posición relativa de O6, *gauche* (g) o *trans* (t), respecto a O5 y C4, es decir *gauche-gauche* (gg), *gauche-trans* (gt) y *trans-gauche* (tg) (Figura 3.12). Las preferencias conformacionales entorno a ω para cada tipo de monosacárido están influenciadas sobre todo por razones estéricas, y siendo uno de los factores más importantes la orientación del sustituyente en la posición 4. Así, por ejemplo, para la D-Glucosa, La conformación *tg* está muy desfavorecida por razones estéricas, ya que OH₄ está orientado hacia el mismo lado que OH₆, de tal manera que predominan las formas *gg* y *gt*. Por las mismas razones, para D-Galactosa, es la forma *gg* la desfavorecida, de tal manera que el equilibrio conformacional consta de las formas *gt* y *tg*. [30][31]

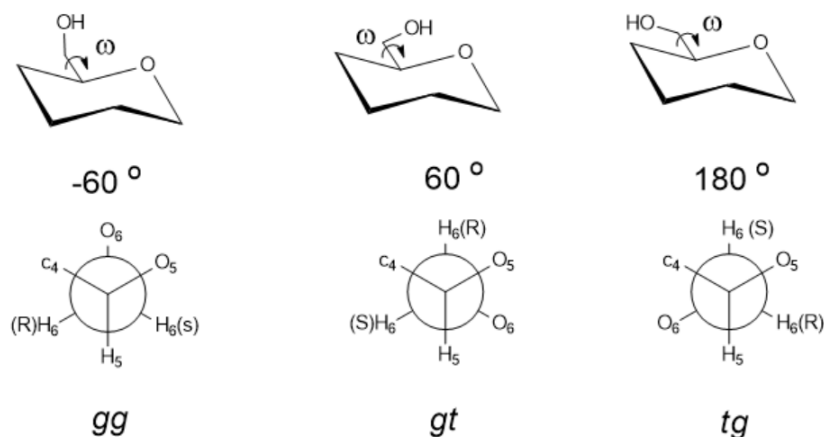


Figura 3.12. Conformaciones alrededor del ángulo diedro ω en una D-Hexosa.

Oligosacáridos. Los azúcares complejos se forman por la unión de monosacáridos a través de enlaces O-glicosídicos. Este enlace se forma a partir de la reacción entre uno de los grupos hidroxilo de un monosacárido con el grupo hemiacetal ó acetal de otro monosacárido, liberando una molécula de agua. El enlace glicosídico presenta flexibilidad conformacional entorno a los dos ángulos diedros que lo componen, definidos como phi (ϕ)= $H1'-C1'-OX-CX$, siendo X la posición de glicosilación) y psi (ψ)= $C1'-OX-CX-HX$.

El efecto exo-anomérico. En analogía con en efecto anomérico, el **efecto exo-anomérico** tiene una influencia determinante en las preferencias conformacionales entorno al diedro phi (ϕ) de un enlace glicosídico. Se trata nuevamente de un efecto estereoelectrónico. En este caso, la deslocalización electrónica estabilizante se produce entre uno de los pares de electrones libres del oxígeno exo-cíclico (O1) al orbital sigma antienlazante del enlace O5-C1. Para que se cumpla esto, el par de electrones libres del oxígeno exocíclico, debe de encontrarse en disposición anti-periplanar con respecto al orbital antienlazante O5-C1 (Figura 3.13). Esto se cumple en dos de las tres conformaciones alternadas posibles, que pasan a llamarse conformaciones exo-anoméricas, en contraposición con la alternativa, que se denomina no-exo-anomérica (Figura 3.13). Las dos conformaciones anoméricas se denominan *exo-anti* y *exo-syn*, siendo generalmente la *exo-anti* más desfavorable energéticamente debido al impedimento estérico entre O5, R, C2, todos hacia el mismo lado (Figura 3.13). Como resultado de todo esto, el enlace diedro phi (ϕ) de la gran mayoría de los enlaces glicosídicos se encuentra exclusivamente en una conformación *exo-syn*.

Por su parte, las preferencias conformacionales entorno al diedro ψ están sobre todo influenciadas por razones estéricas. ^[32]

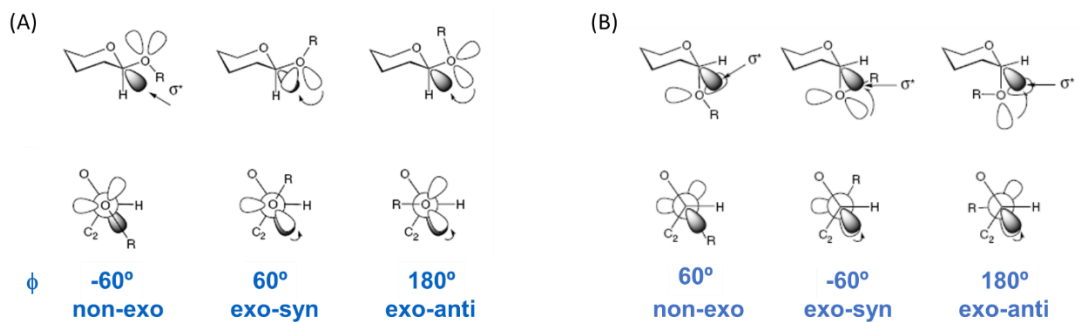


Figura 3.13. Conformaciones alrededor de los enlaces glicosídicos. A) Piranosa con OH1 en disposición ecuatorial. B) Piranosa con OH1 en disposición axial.

4. Métodos

4.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear es una herramienta poderosa y versátil, ampliamente utilizada para el estudio de la estructura, dinámica y cinética de una gran variedad de sistemas biológicos.

El experimento de RMN más sencillo es el ^1H monodimensional (Figura 4.1 (A)), en el cual se emite un pulso de radiofrecuencias a todos los protones de la muestra, creando una magnetización neta, que, tras la relajación, permite medir las señales de resonancia tras la detección de las mismas y la aplicación de una transformada de Fourier (**FT**), pasando desde un dominio de tiempo (Figura 4.1 (B)), a un dominio de frecuencia (Figura 4.1 (C)). Así, mediante este experimento se pueden obtener los distintos desplazamientos químicos, así como las constantes de acoplamiento, de todos los protones de la muestra bajo estudio. ^[33]

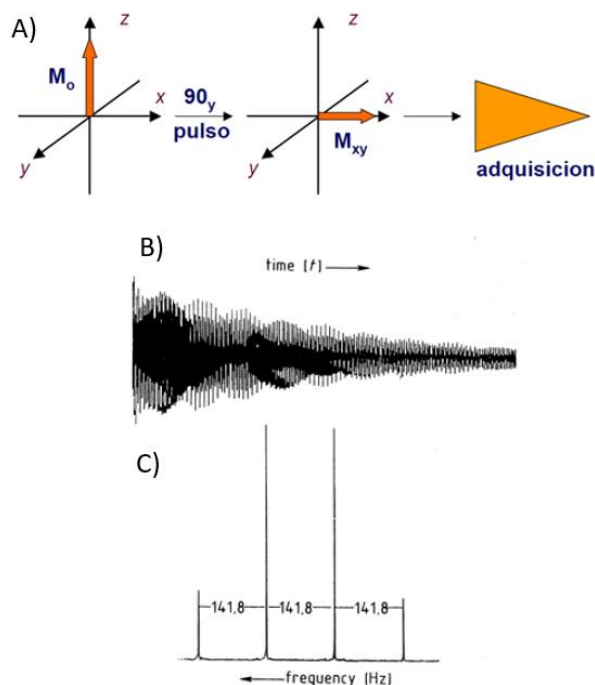


Figura 4.1. A) Secuencia de pulsos para un experimento ^1H monodimensional. B) Espectro en el dominio del tiempo (Free Induction Decay, FID). C) Espectro de dominio de frecuencia obtenida mediante Transformada de Fourier de la FID (en este caso, espectro ^{13}C de CH_3OH , 22.63 MHz).

Sin embargo, debido a que la mayoría de las biomoléculas poseen un alto número de protones, sus espectros de ^1H monodimensionales sufren de un severo efecto de solapamiento de señales, lo que en la mayoría de los casos dificulta o impide el análisis estructural. Debido a ello se recurre habitualmente a la espectroscopia de RMN en 2 dimensiones (2D-NMR), dando lugar a experimentos de RMN que puede ser homo- (correlacionan el mismo tipo de núcleo, p. ej. ^1H) o heteronucleares (correlacionan dos tipos de núcleos diferentes, p. ej. ^1H y ^{13}C). En el primer grupo cabe destacar el experimento **TOCSY** (TOtal Correlation Spectroscopy), basado en el principio de la polarización cruzada, y que supone una herramienta muy útil para identificar sistemas de espín, ya que correlaciona protones acoplados escalarmente. Otro experimento homonuclear ampliamente utilizado es **2D-NOESY**, basado en el efecto nuclear Overhauser (**NOE**), que se origina por la relajación cruzada entre núcleos próximos en el espacio (a una distancia menor de 4\AA). La intensidad del efecto NOE entre dos núcleos depende de la distancia entre ellos según la relación $I_{\text{NOE}} \propto d^{-6}$. Al mismo tiempo, como la relajación depende críticamente de los movimientos moleculares, el signo e intensidad del efecto NOE también se ven afectados por dichos movimientos, que están a su vez íntimamente relacionados con el tamaño molecular. Esta dependencia se representa en la Figura 4.2, donde en el eje de las abscisas se representa el tamaño molecular en forma de tiempo de correlación rotacional (τ_c), que mide la velocidad de movimiento de una molécula cuando está en disolución. Así, se puede ver, que a tiempos de correlación bajos (*tumbling* rápido, es decir moléculas pequeñas), el NOE es de signo positivo y poco intenso, mientras que a tiempos de correlación altos (*tumbling* lento, es decir moléculas grandes), el signo del NOE es negativo e intenso. Entre ambos extremos, existe una correlación crítica τ_c^{crit} , para la cual el NOE efectivo es cero, causando la desaparición de los picos de cruce en el correspondiente espectro NOESY. Esto ocurre para las moléculas cuya masa molar se encuentre entre 1000 y 3000 Da. Para solventar este problema, se recurre al experimento ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy) Este experimento tiene la ventaja fundamental de que el ROE es siempre positivo (Figura 4.2) independientemente del tamaño de la molécula y de la frecuencia del espectrómetro. Por tanto, se usa normalmente para detectar interacciones dipolares entre protones que pertenecen a moléculas de tamaño intermedio, para las que los NOEs son muy pequeños.

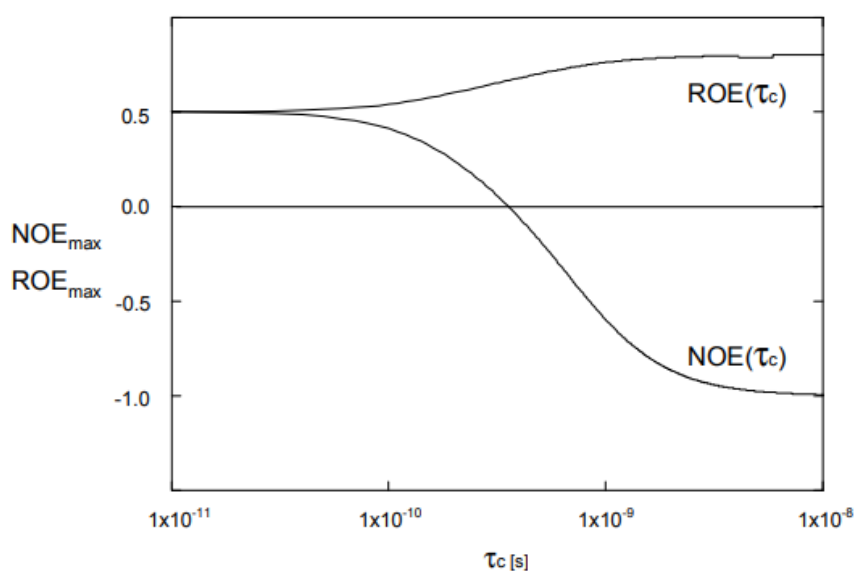


Figura 4.2. Variación del NOE y ROE con el tiempo de correlación.

Por otro lado, el experimento **heteronuclear ^1H - ^{13}C -HSQC** correlaciona átomos de ^1H y ^{13}C que estén unidos directamente mediante enlace covalente, y es una herramienta muy útil en la determinación estructural de carbohidratos.

4.2. RMN: aplicación al reconocimiento molecular (proyecto 1)

Los experimentos RMN, pueden resultar de gran utilidad para el estudio de las interacciones entre proteínas y sus ligandos, lo que puede resultar útil en la industria farmacéutica. Esta técnica presenta una serie de ventajas:

1. Es capaz de detectar interacciones débiles, del orden de K_D milimolar.
2. Permite de determinar las constantes de unión.
3. Los espectros RMN permiten diferenciar las señales de los componentes de la mezcla de forma individual, permitiendo el análisis por separado de los mismos.
4. Permite estudiar sistemas en disolución.
5. Permite identificar efectos dinámicos.

Muchas de las estrategias de RMN para estudiar fenómenos de reconocimiento molecular se basan en el distinto comportamiento que presentan las moléculas grandes (los receptores proteicos) y las moléculas pequeñas (los ligandos) en disolución (Figura 4.3). Así, las proteínas, debido a su gran tamaño y gran densidad de núcleos activos en RMN, presentan una relajación rápida, una difusión lenta, y efecto NOE negativo. Por otra parte, si el ligando es una molécula pequeña, se caracterizará por una lenta relajación, una difusión rápida y NOEs positivos. En un sistema en disolución, donde uno o varios ligandos estén en presencia de un receptor de gran tamaño, aquellos ligandos que interactúen con el receptor adquirirán las propiedades de molécula grande. Este cambio de comportamiento se aprovecha en diferentes estrategias de RMN para detectar y caracterizar los fenómenos de reconocimiento molecular.

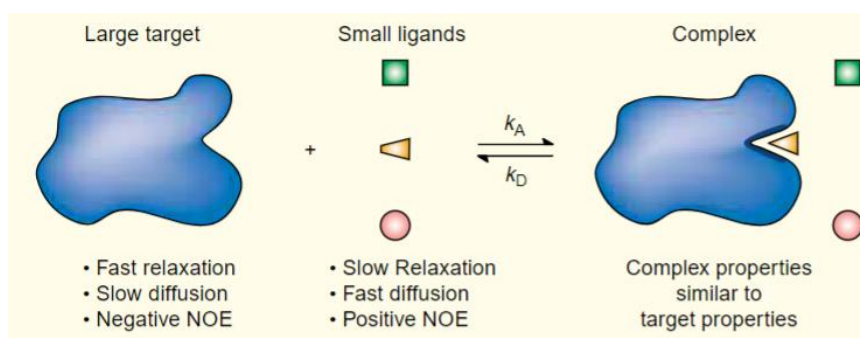


Figura 4.3. Consecuencias globales en interacciones ligando-proteína.

Estudio del ligando: ^1H -STD-NMR (Saturation Transfer difference). ^{[34] [35]}

El método de ^1H -STD-NMR se utiliza para detectar y caracterizar interacciones de baja afinidad (K_D entre 10^{-8} a 10^{-3} M) entre una proteína y ligandos de pequeño tamaño. La velocidad de transferencia de magnetización por relajación cruzada es proporcional al tiempo de correlación rotacional τ_c , de tal manera que para proteínas grandes la transferencia de magnetización es rápida y eficiente. En esta metodología, se satura selectivamente mediante

un pulso de radiofrecuencias en una región del espectro de ^1H donde haya exclusivamente señales de la proteína, ninguna del/los ligando/s. La magnetización es eficientemente transferida a todos los protones de la proteína por relajación cruzada mediante un proceso conocido como difusión de espín. En el caso de que una molécula pequeña se una a la proteína, esta molécula también recibirá cierta transferencia de magnetización (figura 4.4). Si la interacción entre la proteína y el/los ligando/s es tal que el ligando sale del sitio de unión y relaja en el estado libre, su señal será menos intensa (por la relajación cruzada con la proteína) que en ausencia de la saturación de la proteína. Así, en este método se adquieren dos espectros de protón de una muestra de la proteína con un exceso de ligando/s, uno con saturación de la proteína (espectro *on-resonance*) y otro sin saturación (espectro *off-resonance*) (Figura 4.4). La resta de estos dos espectros es el llamado **espectro de STD**, en el cual las señales de los protones de el/las molécula/s pequeña/s que no están en contacto próximo con la proteína se cancelan (son de igual intensidad en los espectros *on-resonance* y *off-resonance*), mientras que aquellas que están en el sitio de unión a la proteína no se cancelan y son las únicas que aparecen en el espectro de STD. [36] La intensidad de la señal de STD dependerá además de la proximidad a los protones de la proteína, de tal manera que los protones del ligando en contacto más íntimo con la proteína tendrán señales de STD más intensas, y los más alejados, intensidades de STD más débiles.

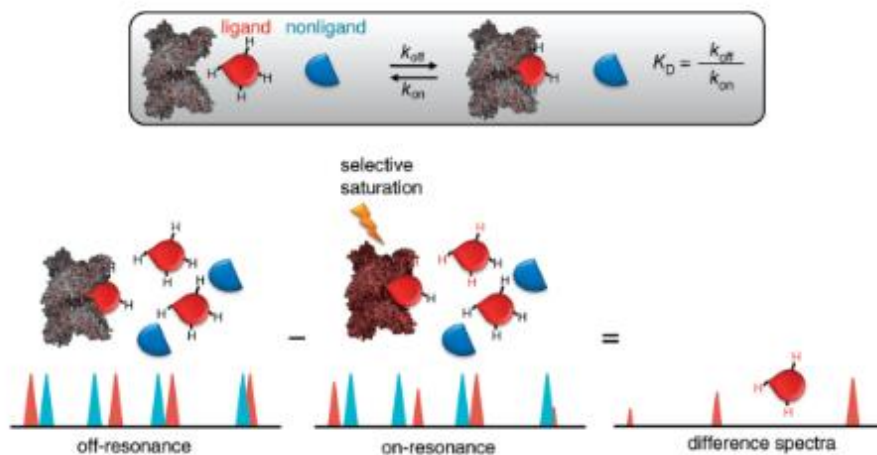


Figura 4.4. Esquema del funcionamiento del experimento ^1H -STD-NMR.

El experimento ^1H -STD-NMR permite identificar los ligandos que se unen a una proteína determinada (incluso de una mezcla de ligandos), y además permite deducir el epítipo de unión, es decir, las partes del ligando que están directamente unidas a la proteína, las responsables de la especificidad de la unión.

Estudio de la proteína: CSP (Perturbación en el desplazamiento químico) [37]

La interacción entre dos moléculas produce un cambio en el entorno químico de los átomos implicados directamente en la unión, lo que se ve reflejado en el **desplazamiento químico** ($\delta(\text{ppm})$), muy sensible a estos cambios. Así, el análisis de la **perturbación de desplazamiento químico (CSP chemical shift perturbation)** de los núcleos de una molécula en presencia de otra, se convierte en un parámetro muy útil para entender las bases estructurales de la especificidad del fenómeno de reconocimiento molecular entre ellas. Además, el seguimiento de los CSPs permite la estimación de la constante de afinidad del equilibrio de unión.

La unión de un ligando a una proteína, además de producir cambios en el entorno químico de los átomos del sitio de unión de la proteína, puede producir cambios conformacionales en la proteína (alosterismo).^[38]

4.3. RMN: aplicación al estudio conformacional de carbohidratos (proyecto 2).

Como hemos visto, los carbohidratos se caracterizan por poseer cierto grado de flexibilidad conformacional. La RMN es la técnica de referencia para determinar las preferencias conformacionales de los carbohidratos.^{[39] [40]}

Uno de los parámetros de RMN más útiles para este tipo de estudios es el acoplamiento escalar, concretamente el **acoplamiento escalar homonuclear a tres enlaces** $^3J_{(H-H)}$. La relación entre ángulo diedro (θ) y $^3J_{(H-H)}$ está definida por la ecuación de Karplus que tiene la forma general:

$$^3J(\theta) = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C$$

A, B y C son parámetros que se derivan empíricamente y dependen de los tipos de átomos y sustituyentes. Para carbohidratos, la ecuación de Karplus fue parametrizada por Hasnoot y Altona.^[41] De esta manera, conociendo el valor de $^3J_{(H-H)}$, podemos determinar el valor del ángulo diedro entre los dos protones vecinales, y definir así la/s conformación/es existente/s.

Pongamos el caso de la D-Glucosa, por ejemplo. Como se ha dicho anteriormente, los anillos de piranosa adoptan preferentemente conformaciones de tipo silla (C), que pueden ser, 4C_1 y 1C_4 (figura 3.16). En la primera, 4C_1 , H₁ y H₂ se encuentran en orientación diaxial, con un ángulo diedro de 180°, lo que según la relación de Karplus, resulta en una $^3J_{(H_1,H_2)}$ entre 9-11Hz. Mientras, para la conformación alternativa, 1C_4 , H₁ y H₂ se encuentran ambos en orientación ecuatorial, con un ángulo diedro de 60°, por lo que $^3J_{(H_1,H_2)}$ será menor de 4Hz.

Otro de los parámetros fundamentales en RMN de carbohidratos es el **efecto NOE**, que se describió anteriormente. Así, por ejemplo, para el ejemplo anterior, en la conformación 4C_1 , H1 tendrá NOE con H3 y H5, mientras que en la conformación 1C_4 , tendrá NOE exclusivamente con H2.

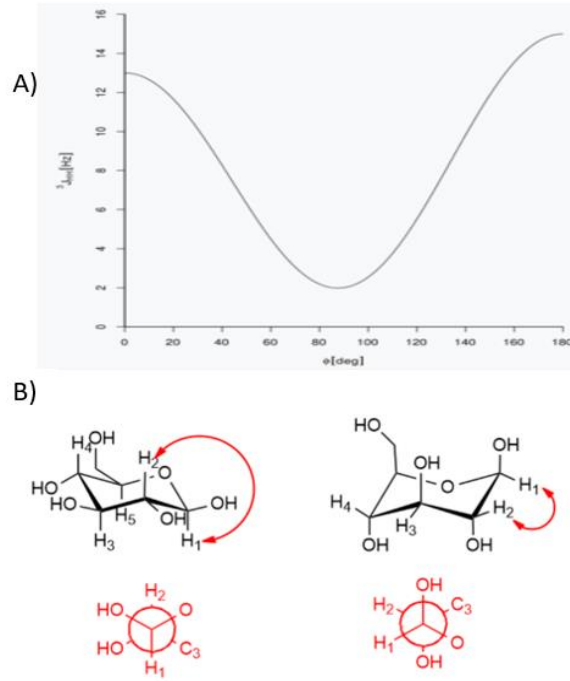


Figura 4.5. A) Curva de Karplus, relación entre el ángulo diedro (ϕ) y $^3J_{HH}$. B) Conformaciones 4C_1 (izquierda) y 1C_4 (derecha) de D-Glucosa y proyección de Newman entorno a C1-C2.

El NOE es también fundamental para la determinación de las preferencias conformacionales entorno a los enlaces glicosídicos. Así, la medida de la intensidad de los NOE entre protones interresiduales proporcionan una estimación de las distancias entre ambos protones, a partir de lo que se puede determinar la disposición relativa de ambos residuos. La estimación requiere disponer de una distancia interprotónica de referencia fija (por ejemplo, H1-H3 en una silla 4C_1 , que es 2.5 Å para la que se pueda obtener la intensidad de NOE. Así, la distancia entre los protones a y c (r_{ac}) se puede estimar a partir de la relación:

$$\frac{r_{ac}}{r_{ab}} = \left(\frac{n_{ac}}{n_{ab}} \right)^{-1/6}$$

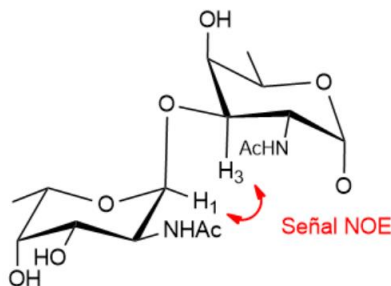


Figura 4.6. Arriba: relación entre NOE y la distancia entre dos átomos. Abajo: señales NOE entre dos protones próximos en el espacio.

donde n_{ac} y n_{ab} son los NOE entre los protones a-c y a-b respectivamente, que se determinan experimentalmente, y r_{ab} es la distancia de referencia. (Figura 4.6)

4.4. Métodos computacionales.^[42]

Minimización de Energía (QM):

Con el fin de obtener modelos moleculares de los complejos entre la Lisozima y diferentes elementos de la DCL, las geometrías de diferentes componentes de la DCL fueron optimizadas, para lo cual se utilizaron distintos niveles de cálculo, que fueron comparados.

Los métodos semiempíricos se caracterizan por emplear el mismo concepto de los métodos *ab initio*, pero introduciendo diversas simplificaciones para que el coste computacional sea menor. Los métodos semiempíricos no calculan todas las integrales electrónicas, sino que las resuelven parametrizando en el proceso algunas variables, es decir basándose en datos experimentales (Potenciales de ionización, electro-afinidades). En este caso se ha usado el método AM1 (Austin Model 1), cuyas principales características son: 1) sobreestimación de los puentes de hidrógenos, de tal manera que, a menudo, las geometrías obtenidas con este método que contengan puentes de hidrógenos resultan ser erróneas. 2) Los grupos alquilo suelen ser muy estables (2 Kcal/mol por cada metileno). 3) Los grupos nitro suelen ser inestables. 4) Los enlaces O (sp³)-O(sp³) son muy cortos 0,17 Å. 5) Predice, para el caso del metanol, que la conformación gauche es más estable que la antiperiplanar.

El nivel de cálculo DFT (Teoría del funcional de la densidad) simplifica los cálculos calculando las propiedades electrónicas a partir de la densidad tridimensional de las nubes electrónicas del sistema. Los cálculos DFT son conceptual y computacionalmente similares a los métodos Hartree-Fock, pero sus resultados son mucho mejores. El principal inconveniente de estos métodos es la incapacidad de mejorar los resultados sistemáticamente, lo que se traduce en la errónea descripción de algunas características, como las interacciones de van der Waals.

En este trabajo, los cálculos DFT se ha realizado empleando el funcional de correlación de intercambio híbrido con tres parámetros de Becke y Lee-Yang-Parr (B3LYP) a un nivel de teoría 6-31G (d,p) incorporado en el programa Gaussian 09.

Durante todos los procesos de optimización de las geometrías no se han aplicado restricciones de simetría y se ha confirmado que las estructuras son mínimos, al menos locales, por ausencia de frecuencias imaginarias

Docking molecular:

El proceso de Docking, mediante el cual se modela la unión de un ligando a un receptor, posee seis grados de libertad, tres rotacionales y tres traslacionales. Básicamente son cálculos computacionales basados en la mecánica cuántica. Este método describe los átomos como esferas de un radio determinado, que se unen entre sí mediante enlaces que se tratan como si fueran muelles que obedecen al oscilador armónico. Se utiliza principalmente para predecir los posibles modos de unión e interacciones entre un determinado compuesto (Ligando) y una macromolécula (Receptor). Es una técnica muy poderosa cuando se tienen buenos modelos 3D del receptor (PDB: Protein Data Bank).

Búsqueda conformacional: ^[43]

Para llevar a cabo la búsqueda conformacional se ha utilizado el método MCMM (Monte Carlo Multiple Minimum). Así, partiendo de una geometría dada (generalmente un mínimo local) se producen distintos cambios en la estructura, dando lugar a una familia de diferentes conformaciones, que se clasifican en función de su energía.

Así, cada etapa consiste en 1) Seleccionar un conformero existente. 2) Se introducen cambios aleatorios (ajustando los ángulos diedros y los enlaces rotables) 3) Ajustes en los anillos (Ruptura de enlaces del anillo, rotación de dichos enlaces, y posterior ciclación. 4) Correcciones (Minimización, revisión de la estereoquímica, ventana energética)

Este método tiene la ventaja de que es aplicable tanto a moléculas grandes como las pequeñas, también es eficaz si las rotaciones sobre un pequeño número de enlaces pueden producir un gran cambio conformacional. Sin embargo, tiene algunas desventajas, como la necesidad de limitar el número de rotaciones simultáneas. Para llevar a cabo estas simulaciones, se ha utilizado el campo de fuerzas de AMBER*.

5. Proyecto 1: bases estructurales de la amplificación por química combinatoria dinámica dirigida por proteínas del nuevo inhibidor de la lisozima (HEWL) A17H18.

5.1 Objetivos.

El objetivo de este proyecto es determinar las bases estructurales de la amplificación del ligando A17H1 en la DCL anteriormente descrita en presencia de HEWL. Para ello, se llevaron cabo una serie de experimentos de RMN, así como diferentes protocolos computacionales, con el objetivo profundizar en las bases estructurales del fenómeno de reconocimiento molecular entre HEWL y diferentes componentes de la DCL.

Así, los objetivos concretos son:

- Empleo de la técnica ^1H -STD-NMR para determinar la existencia o no de interacción entre diferentes componentes de la DCL y HEWL.
- Asignación de las señales de ^1H de la HEWL mediante experimentos TOCSY/NOESY, en presencia y ausencia de A17, H18 y A17H18.
- Análisis de la perturbación en el desplazamiento químico (CSP) de HEWL por parte de A17, H18 y A17H18 y determinación del sitio de unión.
- Optimización de la geometría de los distintos ligandos usando métodos de mecánica cuántica.
- Propuesta, mediante docking molecular, del complejo HEWL - A17H18.

5.2 Procedimientos experimentales.

Materiales. La HEWL fue comprada a Sigma-Aldrich. Los diferentes fragmentos de la DCL fueron proporcionados por la Dra. Pérez-Fernández. El PBS 50 mM a pH 6.3 se preparó a partir una disolución buffer stock (10 mM de fosfato de sodio y 150 mM de cloruro de sodio). El DMSO- d_6 se adquirió a Sigma-Aldrich (CAS No: 2206-27-1).

Preparación de muestras de RMN. *Estudios de RMN basados en la observación del ligando (^1H -STD-NMR).* Las muestras para la adquisición de los experimentos de ^1H -STD-NMR se prepararon en buffer PBS pH 6.3 en D_2O , con una concentración de 60 μM de HEWL y 6 mM (relación molar 1:100) del correspondiente ligando. Los ligandos se añadieron disueltos en DMSO- d_6 , resultando en un 0.16 % de DMSO- d_6 en la muestra final. Los ligandos fueron los fragmentos **A17 y las hidrazidas H18, H31 y H40**. El ligando A17H18 presenta una solubilidad demasiado baja para las condiciones requeridas por este experimento.

Estudios de RMN basados en la observación de la proteína (análisis de CSP). Se prepararon diferentes muestras de HEWL: sola y en presencia de los siguientes fragmentos: **A17 y las hidrazidas H18, H31 y H40**, a diferentes concentraciones y relaciones molares (ver listado más abajo). Desafortunadamente, el ligando **A17H18** mostró una solubilidad demasiado baja para las condiciones requeridas para este análisis y compatibles con la proteína. Se llegó a preparar una disolución 50 μM de A17H18 en ausencia de lisozima, llegando a un porcentaje de DMSO- d_6 del 10% (sabiendo que la proteína es estable a dicha concentración) sin que se observase ninguna mejora en la solubilidad ni perturbaciones en las señales de HEWL. Todas las disoluciones se prepararon en PBS 50 mM a pH 6.3 en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (relación de 90/10). Se requirió un porcentaje de un 4% de DMSO- d_6 para la solubilización de los fragmentos.

- **Lisozima libre:** 1 mM de HEWL, 4% de DMSO- d_6 , pH= 6.3 (Buffer: PBS), disolvente: $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10). Espectros adquiridos: ^1H (NS:320); TOCSY (NS: 24, mixing time: 40 ms); NOESY (NS:24, mixing time: 100 ms)
- **Lisozima + A17:** 181.81 μM de HEWL + 637.7 μM A17 (relación molar 1:3.5). 4% de DMSO- d_6 , pH= 6.3 (PBS), disolvente: $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10). Espectros adquiridos: ^1H (NS:320); TOCSY (NS:98, mixing time: 40 ms); NOESY (NS:90, mixing time: 100 ms)

- **Lisozima + H18:** 200 μm de HEWL + 6 mM H18 (relación molar 1:30). 4% de DMSO- d_6 , pH= 6.3 (PBS), disolvente: $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10). Espectros adquiridos: ^1H (NS:320); TOCSY (NS:64, mixing time: 40 ms); NOESY (NS:64, mixing time: 100 ms)
- **Lisozima + H31:** 200 μm de Lisozima, 6 mM H31 (relación molar 1:30). 4% de DMSO- d_6 , pH= 6.3 (PBS), disolvente: $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10). Espectros adquiridos: ^1H (NS:32)
- **Lisozima + H40:** 200 μm de Lisozima, 6 mM H40 (relación molar 1:30). 4% de DMSO- d_6 , pH= 6.3 (PBS), disolvente: $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10). Espectros adquiridos: ^1H (NS:32).

Adquisición de espectros de RMN. *Espectros de ^1H -STD-NMR.* (NS:128, con supresión de agua). Los experimentos STD se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Advance 600 MHz, a 308K.

Espectros para CSP análisis. Se realizaron espectros de ^1H , TOCSY (tiempo de mezcla 40ms) y NOESY (tiempo de mezcla 100ms) a 308 K en un espectrómetro Bruker Advance 800 MHz. Se utilizaron secuencias estándar de Bruker con supresión de agua.

Asignación de los espectros de HEWL. La asignación de los espectros 2D de HEWL se realizó en el programa CCPNMR (versión 3.0.4 para Windows).^[44] Se tomaron como referencia los datos publicados en 1988.^[13]

Mecánica cuántica. La estructura de los fragmentos de construyó en GaussView 6.0 para su posterior minimización mediante cálculos mecanocuánticos usando el paquete Gaussian 09. La optimización se llevó a cabo usando funcionales híbridos DFT (B3LYP-6-31G).

Docking Molecular. El complejo entre HEWL y H18 se construyó usando el software GOLD, en base a los datos experimentales de RMN, para lo cual se usó el pdb 1E8L, obtenida mediante NMR^[45] y la estructura del ligando optimizada en Gaussian.

5.3 Resultados y discusión

Primeramente, se realizó un estudio para determinar la capacidad de diferentes fragmentos de la DCL para interactuar con HEWL, lo que se llevó a cabo mediante experimentos de ^1H -STD-NMR. A continuación, se llevó a cabo un estudio de perturbación de desplazamiento químico de las señales de a HEWL por parte de diferentes fragmentos de la DCL para identificar el sitio de unión a la proteína. Para ello, se asignaron las señales de ^1H de la HEWL en presencia y ausencia de los fragmentos de interés, mediante experimentos homonucleares bidimensionales TOCSY y NOESY. Desafortunadamente, en ninguno de estos estudios se pudo incluir el ligando A17H18, debido a su baja solubilidad.

Experimentos de ^1H -STD. Se escogieron fragmentos de la DCL de diferente naturaleza química para determinar si son ligandos de HEWL. **H18** es el fragmento que da lugar al inhibidor A17H18 y contiene un anillo de 2-clorotiofeno como grupo R en la hidrazida. **H31**, presenta un grupo R de naturaleza química muy diferente, ya que se trata de un ciclopropano, es decir alifático. Por su parte **H40**, contiene un grupo aromático fenol, es decir misma naturaleza que H18, pero diferentes propiedades. Tanto A17 como A17H18 no se pudieron incluir debido a su baja solubilidad.

Los espectro de STD se llevaron a cabo en muestras con una relación molar proteína: ligando de 1:100, con una concentración de la proteína de 60 μM . La frecuencia de irradiación se situó en la zona alifática para los ligandos H18 y H40 y en la zona aromática para el ligando H31. De esta manera se evita la irradiación directa del ligando.

En la figura 5.1, se muestra el resultado del experimento de STD para la muestra con el ligando H18. El espectro azul (arriba) muestra el espectro *off-resonance*, donde aparecen todos los protones del ligando, en este caso los dos protones aromáticos del clorotiofeno. La flecha azul

indica la frecuencia de irradiación en el espectro *on-resonance* (que no se muestra). El espectro en rojo (abajo) es el espectro STD, en el que aparecen las señales de los protones del ligando con igual intensidad. Esto indica que **H18 es un ligando de HEWL**, uniéndose de manera débil (requisito para que se dé el efecto STD), y que ambos protones aromáticos están cerca de la proteína en el complejo proteína-ligando. Aparece además una montaña de señales a campo alto, en la zona alifática, que son las señales de la proteína irradiadas por el pulso *on-resonance*.

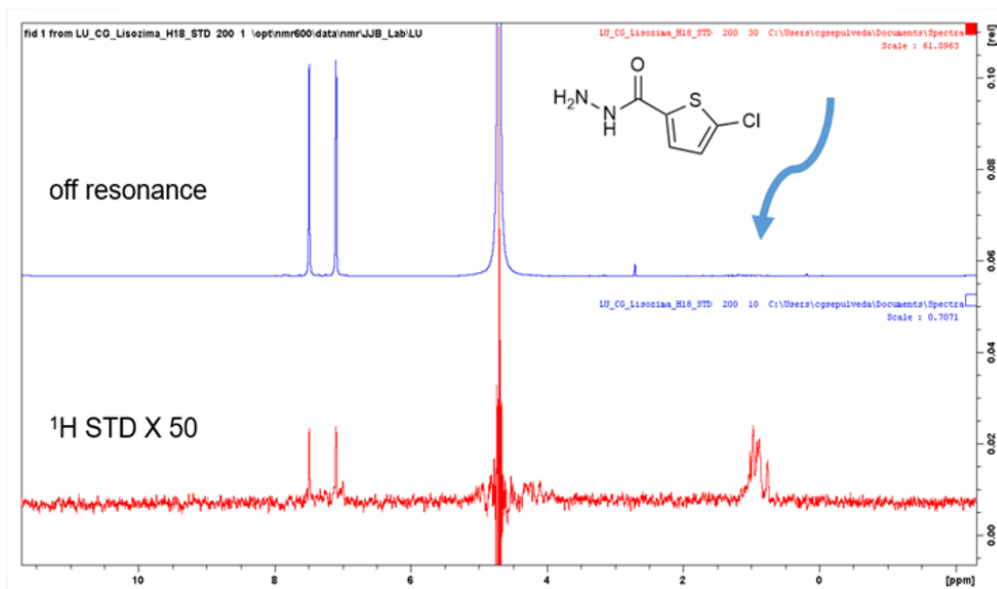


Figura 5.1. Experimento STD para HEWL y H18. Arriba, en azul, espectro *off-resonance* con irradiación en la región alifática (indicado por la flecha azul). Abajo, en rojo espectro STD.

El experimento STD para **H31**, se muestra en la figura 5.2. El espectro STD (abajo, en rojo) no muestra ninguna señal correspondiente al ligando, lo que demuestra que **H31 no es un ligando de HEWL**.

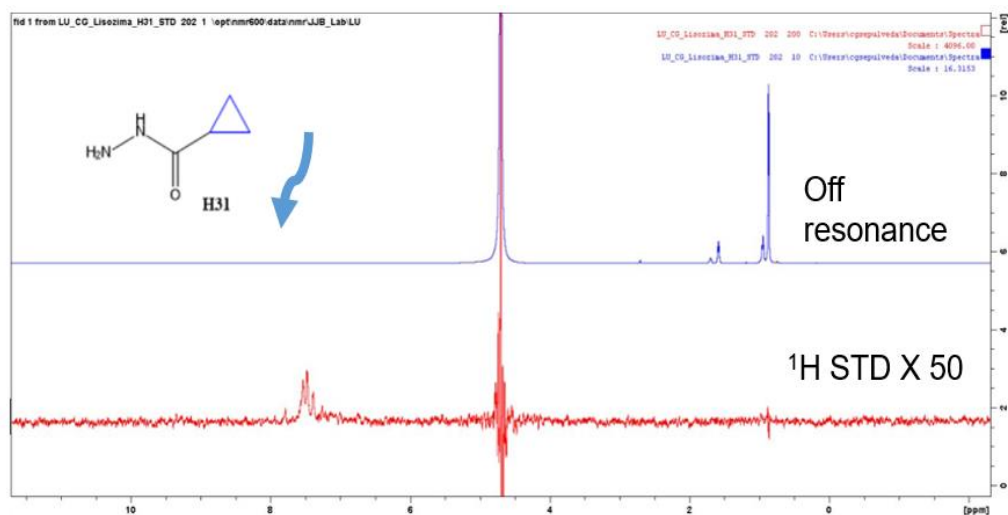


Figura 5.2. Experimento STD para HEWL y H31. Arriba, en azul, espectro *off-resonance* con irradiación en la región aromática (indicado por la flecha azul). Abajo, en rojo, espectro STD.

Finalmente, se repitió el experimento para H40 (figura 5.3). En ese caso, el espectro STD (espectro azul, abajo) tampoco mostró ninguna señal correspondiente al ligando, demostrando que **H40 tampoco es un ligando de HEWL**.

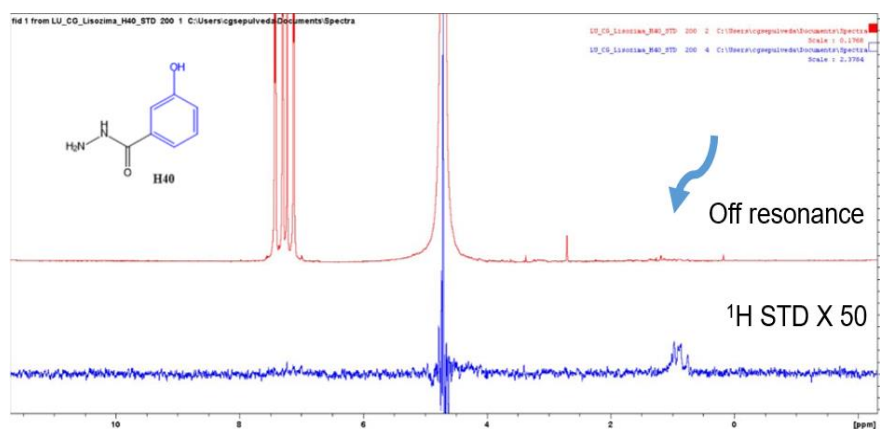


Figura 5.3. Experimento STD para HEWL y H40. Arriba, en rojo, espectro *off-resonance* con irradiación en la región aromática (indicado por la flecha azul). Abajo, en azul, espectro STD.

Consecuentemente, en base a los resultados obtenidos, se puede concluir que HEWL interactúa únicamente con **H18**.

Observación de las señales de la proteína. Primeramente, se adquirieron los espectros de ^1H de las siguientes muestras: 1) Lisozima libre. 2) Lisozima con **H18**. 3) Lisozima con **H40**. 4) Lisozima con **A17**. 5) Lisozima con **H31**. La superposición de estos cinco espectros se muestra en la figura 5.4, ampliadas en diferentes regiones: (A) región donde resuenan los protones de las cadenas laterales aromáticas, (B) región donde resuenan los protones $\text{H}\alpha$ del esqueleto proteico, y (C) región donde resuenan los protones de las laterales alifáticas (C). En esta comparación se aprecian alteraciones espectrales con respecto a la proteína libre solamente en presencia del ligando H18, mientras que para el resto de los ligandos no se aprecian cambios en las señales de la proteína. Esto corrobora los resultados de STD, es decir solamente la hidrazida H18 es un ligando de HEWL. El ligando A17, tampoco parece unirse a la proteína, aunque debido a su baja solubilidad sólo se pudo alcanzar una relación 1:3.5, que es baja para identificar interacciones débiles.

Para conocer el sitio de unión de HEWL al fragmento H18 se llevó a cabo un estudio de perturbación de desplazamiento químico de las señales de HEWL por parte de H18. Para ello, se recurrió a espectros TOCSY y NOESY que permitieron asignar la gran mayoría de los protones de la proteína libre (Figuras 5.6, 5.7, 5.8).

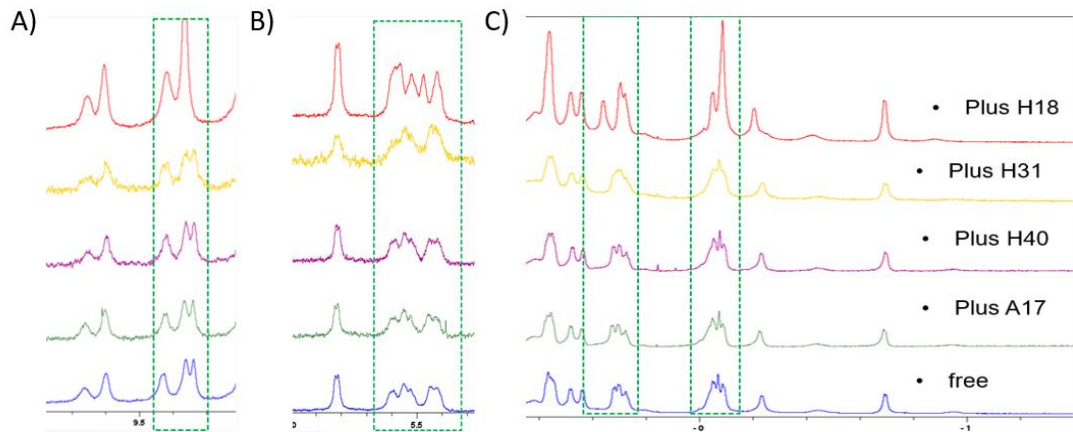


Figura 5.4. Superposición de los espectros ^1H monodimensionales. **Rojo:** HEWL + H18; **Amarillo:** HEWL + H31; **Violeta:** LYS + H40; **Verde:** LYS + A17; **Azul:** LYS. **A)** Ampliación del espectro en la región de las cadenas aromáticas. **B)** Ampliación del espectro en la región $\text{H}\alpha$. **C)** Ampliación del espectro en la región de las cadenas laterales alifáticas.

La asignación se basó en la publicada en 1988, ^[13] que comprende 121 de los 128 residuos de la proteína. Los datos de la asignación se recogen en el Anexo I. Aquellas señales que no se han podido asignar se corresponden a los siguientes aminoácidos: Arg-68; Pro-70; Ser-81; Asn-106.

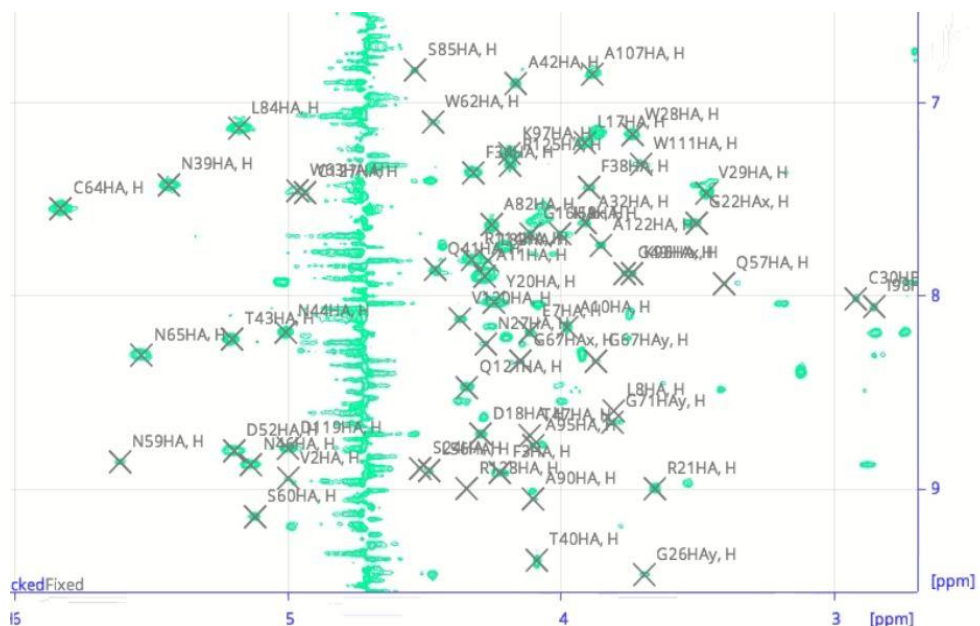


Figura 5.5. Espectro TOCSY asignado de la Lizozima libre, región del esqueleto proteico (los protones $\text{H}\alpha$).

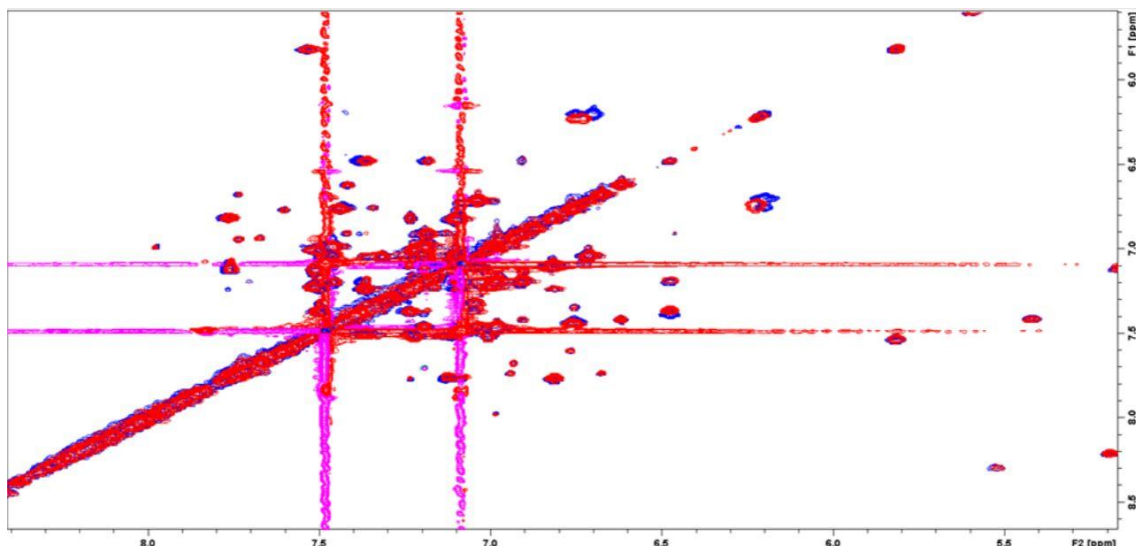


Figura 5.8. Espectro TOCSY de la Lisozima/H18, región de las cadenas laterales aromáticas.

En las figura 5.9 se ilustran diferentes ampliaciones de ambos espectros TOCSY superpuestos, donde las señales en azul corresponden al espectro de la Lisozima libre, mientras los pico en rojo se corresponden con la muestra de Lisozima en presencia de H18. En el mismo, se pueden ver que los picos correspondientes a Ala31, Trp111, A107 y Glu35 sufren perturbación de desplazamiento químico, mientras que otras señales (Arg45) no se ven perturbadas.

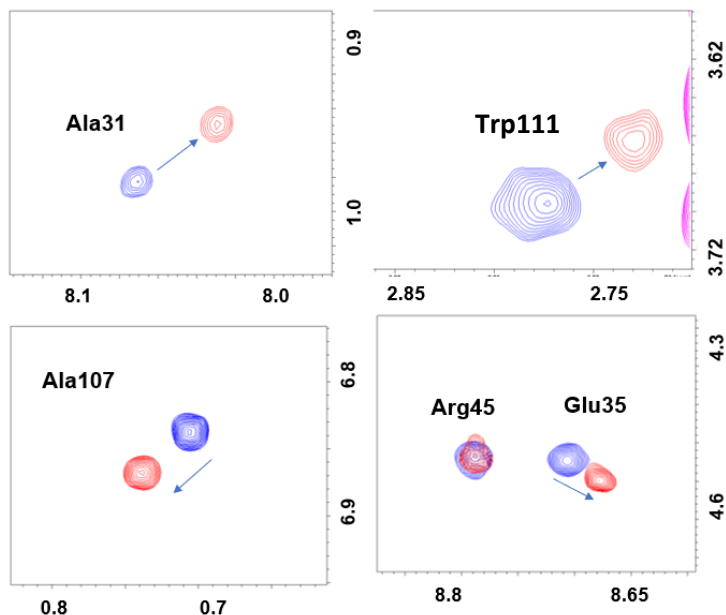


Figura 5.9. Superposición de los espectros TOCSY. HEWL libre (azul). HEWL + H18 (Rojo).

El análisis de perturbación de desplazamiento químico se llevó a cabo mediante la resta del δ (ppm) de cada uno de los protones, en ausencia y presencia de H18. Los datos se agruparon por tipo de protones en función de su posición en el residuo aminoacídico: protones amídicos, protones alfa, protones beta y protones de cadenas laterales. Este análisis se muestra en la

figura 5.10. Para cada gráfico, se tomó arbitrariamente un valor mínimo de CSP como límite para diferenciar los protones con un valor de CSP significativo. Asimismo, se escogió otro valor mayor de CSP como límite para aquellos protones cuyo desplazamiento químico tenga una variación mucho mayor.

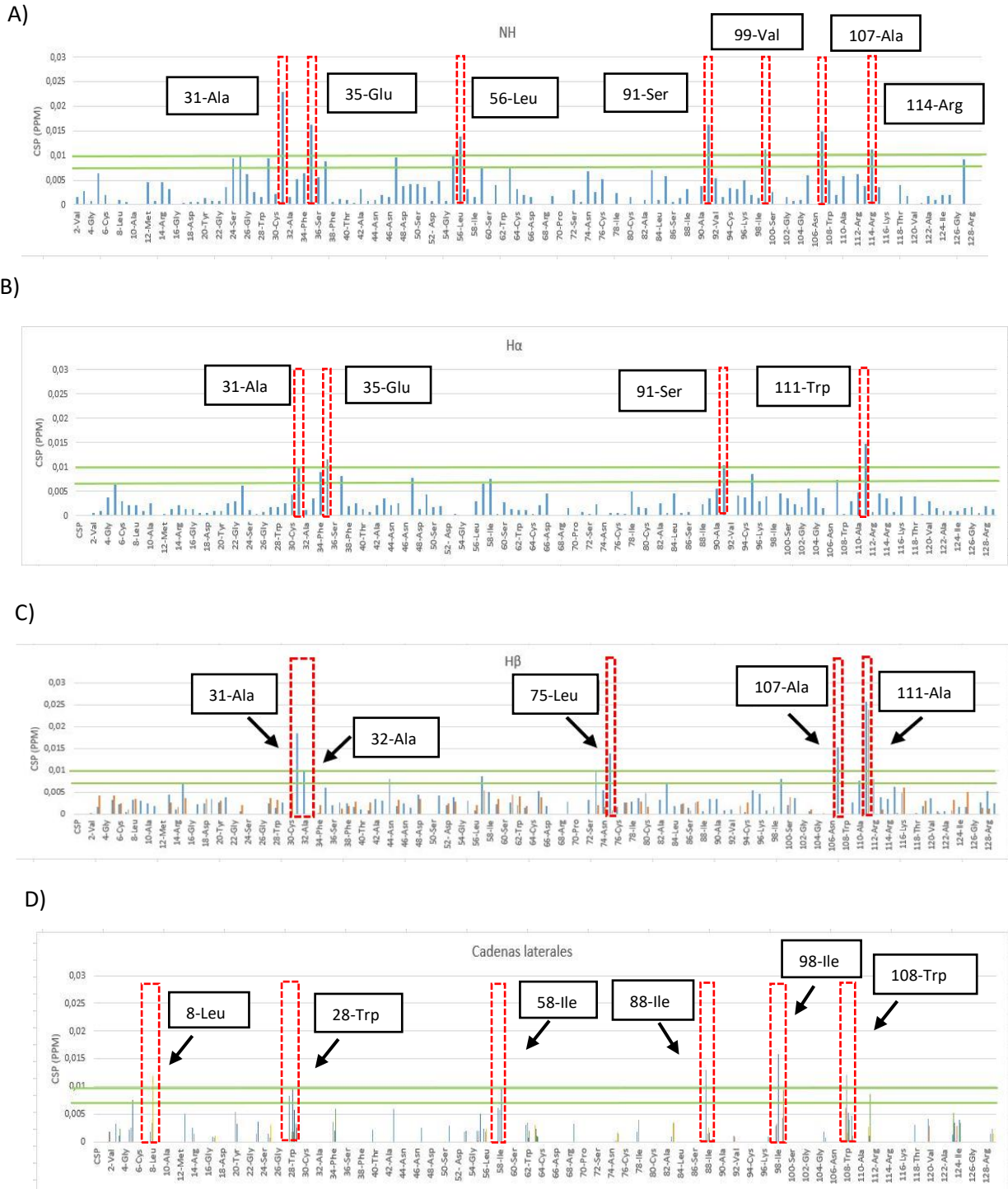


Figura 5.10. Gráficas de perturbación de desplazamiento químico (CSP) de HEWL producidos por H18. A) protones amidicos. B) Protones alfa. C) Protones Beta. D) Cadenas laterales (alifáticas y aromáticas).

Para los **protones amídicos**, los residuos más alterados por la presencia de H18 fueron: **Ala31, Glu35, Leu56, Ser91, Val99, Ala107 y Trp111**. En cuanto a los **protones alfa** fueron los residuos **Ala31, Glu35, Ser91 y Arg111** y para los **protones beta**, **Ala31, Ala32, Leu75, Ala108 y Ala111**. Para las **cadenas laterales**, si se analizan conjuntamente los protones alifáticos y aromáticos, los residuos más afectados fueron **Leu8, Trp28, Leu58, Ile88, Ile98 y Trp108**. Hay que tener en cuenta que los protones de las cadenas laterales de los residuos aromáticos Phe3, Phe34, Phe38, Trp111, Trp123 no se pudieron tener en cuenta por solapamiento con las señales del ligando.

Estos protones se mapearon en la estructura tridimensional de la proteína (pdb 1E8L^[44]) (Figura 5.11), donde en **rojo se destacan aquellos protones cuyo CSP es más significativo, mientras que en naranja, se muestran aquellos que se encuentran perturbados en menor medida**. En el panel c, con el mayor nivel de transparencia de la superficie de la proteína (50%), se aprecia claramente que **todos estos protones están localizados entorno la cavidad que forma el sitio activo de la enzima**. En las imágenes a) y b) con una transparencia menor, del 0 y 40% respectivamente, se pueden observar que algunos de estos protones perturbados se encuentran en la superficie de la proteína, muy probablemente involucrados en interacciones directas con H18.

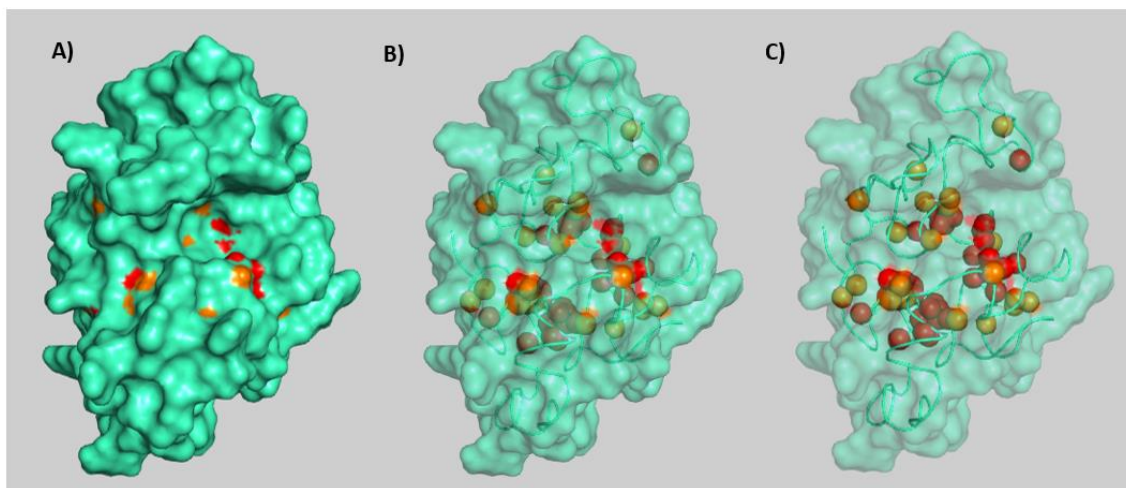


Figura 5.11. Representación tridimensional de HEWL con superficie con diferente grado de transparencia: a) 0%, b) 40% y c) 60%. Los átomos cuyo desplazamiento químico se ha visto más alterado se representan en rojo, y en naranja aquellos perturbados en menos medida.

Entre todos los residuos que se ven afectados por la presencia de H18 caben destacar Glu35 (H α), Gln57 (H β), Asn59 (NH), Ile98 (H δ), Ala107 (H α , H β), 108-Trp (NH), Ala110 (H α , H β), Arg112 (H β), que forman parte del sitio catalítico o conforman el el bostillo del sitio de unión al sustrato.

Docking molecular.

Primeramente, se llevó a cabo la optimización geométrica de los fragmentos estudiados experimentalmente. Para ello, se utilizaron en un primer paso cálculos semiempíricos (**AM1**), los cuales tienen un menor coste computacional. Como contrapartida, estos cálculos son menos exactos, siendo su mayor limitación el empleo de parametrizaciones “a posteriori”. Por ello, en un segundo paso, se procedió al uso funcionales híbridos DFT (**B3LYP/6-31G**), que proporciona geometrías más exactas. Así, se han realizado las optimizaciones de la estructura de los ligandos **A17, H18, H40 y H31**, y de las acilhidrazonas obtenidas por combinación de los distintos fragmentos.

Tras la optimización energética de los ligandos, se llevó a cabo un proceso de modelado molecular de los complejos de los diferentes fragmentos con la lisozima mediante un proceso de Docking. Para ello se emplearon las coordenadas geométricas de la lisozima depositadas en el PDB con el código 1E8L, obtenidas mediante RMN.

Para el Docking molecular se utilizó el programa GOLD. Se tomó el 108-Trp como referencia, ya que los datos experimentales siguieron claramente que está involucrado en la interacción con H18.

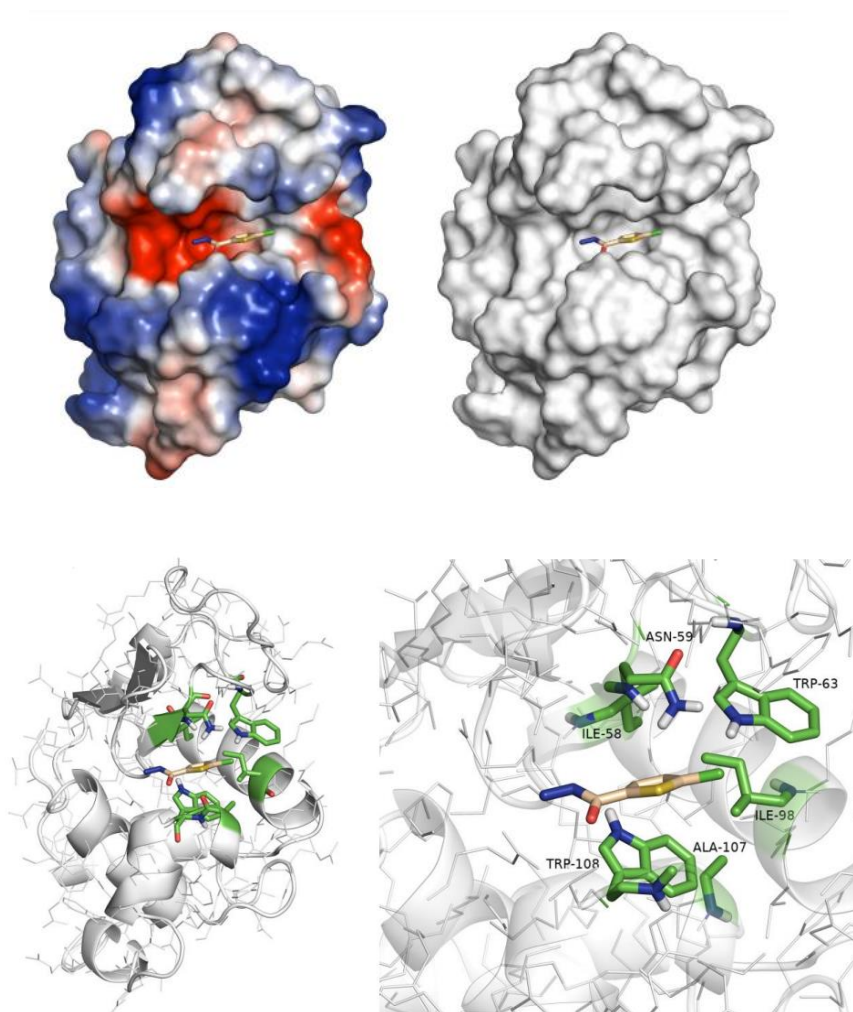


Figura 5.12. Estructura tridimensional del complejo HWEL-H18.

En la figura 5.12, se representan diferentes formas gráficas del complejo entre HWEL y H18 obtenido por Docking. Se puede apreciar cómo la interacción se produce en el surco cargado negativamente que se corresponde con el sitio activo de la enzima, involucrando a los aminoácidos determinados por NMR como más influidos por la presencia del ligando. El complejo se ve estabilizado fundamentalmente por interacciones intermoleculares de tipo Van der Waals.

5.4. Conclusiones.

Se ha llevado a cabo un estudio de reconocimiento molecular, basado en RMN, entre la enzima HWEL y diferentes ligandos componentes de una DCL. Esta DCL fue diseñada por el grupo de la Dra. Ruth Pérez-Fernández y ha permitido identificar el compuesto A17H18 como nuevo inhibidor de la enzima.

Los experimentos de ^1H -STD-NMR, así como experimentos simples de ^1H -RMN, han demostrado que los fragmentos de la DCL H40 y H31 no son ligandos de HWEL. Por el contrario, el fragmento H18, que da lugar al inhibidor A17H18 sí es un ligando de HWEL.

Los estudios de RMN de Chemical Shift Perturbation (CSP), llevados a cabo con HWEL y H18, permitieron identificar el sitio de unión de la enzima al ligando, que coincide con el sitio activo de la misma. En efecto, este análisis desveló que los protones 35-Glu ($\text{H}\alpha$), 57-Gln ($\text{H}\beta$), 59-Asn (NH), 98-Ile ($\text{H}\delta$), 107-Ala ($\text{H}\alpha$, $\text{H}\beta$), 108-Trp (NH), 110-Ala ($\text{H}\beta$), 112-Arg ($\text{H}\beta$) se ven ampliamente perturbados por la presencia de H18, lo que sugiere que estos aminoácidos están de alguna manera implicados en el reconocimiento molecular.

Se ha obtenido, mediante diferentes protocolos de modelado molecular, un modelo molecular para el complejo HWEL-H18, que se está de acuerdo con los datos experimentales de RMN.

El estudio de las interacciones entre HWEL y el inhibidor A17H18 no se pudo llevar a cabo debido a la baja solubilidad de este último bajo las condiciones requeridas para estudios de RMN.

Así, podemos concluir que el fragmento H18 se une de manera débil pero específica a HWEL, coincidiendo el sitio de unión con el sitio activo de la enzima. Aunque no se han podido determinar experimentalmente los detalles del complejo HWEL-A17H18, podemos especular que el modo de unión de H18 a HWEL, en el que el anillo de anillo de 2-clorotiofeno se encaja en un bolsillo hidrofóbico formado por 68-Trp, 108-Trp, 98-Ile y 107-Ala, se mantiene para el complejo con A17H18.

6. Proyecto 2: *Staphylococcus aureus*. Estudio conformacional de polisacáridos capsulares sintéticos

6.1. Objetivos

El proyecto tiene como objetivo el análisis conformacional de dos oligosacáridos (un trisacárido y un nonasacárido) correspondientes al polisacárido capsular CP8 de *S. Aureus*, obtenidos mediante síntesis química en el grupo del Prof. Jeroen Codeé, de la Universidad de Leiden. Se busca lograr lo siguiente:

- Asignación de las señales ^1H y ^{13}C de los oligosacáridos.
- Análisis de los parámetros de RMN, constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H,H}}$ y NOEs interresiduales.
- Obtención de un modelo tridimensional mediante métodos de Mecánica Molecular, basados en los datos experimentales de RMN.

6.2. Procedimiento Experimental

RMN. Se prepararon dos muestras en tubos de RMN de 5mm por disolución del correspondiente oligosacárido en D_2O , resultando en concentraciones de 6.1mM para el trisacárido y 1.53mM para el nonasacárido.

Se han adquirido los siguientes espectros de RMN para cada una de las muestras:

- ^1H -1D (NS: 32)
- ^1H - ^{13}C -HSQC (NS: 24)
- NOESY (NS: 32, 200 ms tiempo de mezcla), solo para el nonasacárido
- ROESY (NS: 24, 200 ms tiempo de mezcla), solo para el trisacárido
- TOCSY (NS: 24, 30 ms tiempo de mezcla) solo para el nonasacárido
- TOCSY (NS: 24, 90 ms tiempo de mezcla)

Todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro BRUKER de 800 MHz, a 298 K, mediante secuencias estándar de Bruker.

Mecánica Molecular. Las estructuras de ambos oligosacáridos se construyeron utilizando el visualizador GaussView 09. Tras esto, se optimizó la geometría de los oligosacáridos usando la funcionalidad Ligprep disponible en Macromodel Schrödinger. Tras ello, se llevó a cabo una búsqueda conformacional, usando el método MCMM (Monte Carlo Multiple Minimum) (en Macromodel Schrödinger) que consiste en rotar aleatoriamente los ángulos diedros de la molécula, optimizándolas posteriormente, en nuestro caso con el campo de fuerzas AMBER* y el modelo continuo de disolvente GB/SA para agua. Cabe destacar que se restringieron todos los ángulos diedros phi (ϕ) de cada uno de los enlaces glicosídicos para cumplir el efecto exo-anomérico, fijándolo en la conformación exo-syn en cada caso. Tras el análisis y la selección de los conformeros que cumplían los datos experimentales, se realizó posterior una minimización.

6.3. Resultados y Discusión.

Análisis conformacional del trisacárido CP8. La asignación de las señales ^1H y ^{13}C del trisacárido se llevó a cabo mediante experimentos TOCSY, NOESY y ^1H - ^{13}C -HSQC. En la figura 6.1 se muestra el espectro ^1H - ^{13}C -HSQC con la asignación de cada uno de los picos de cruce.

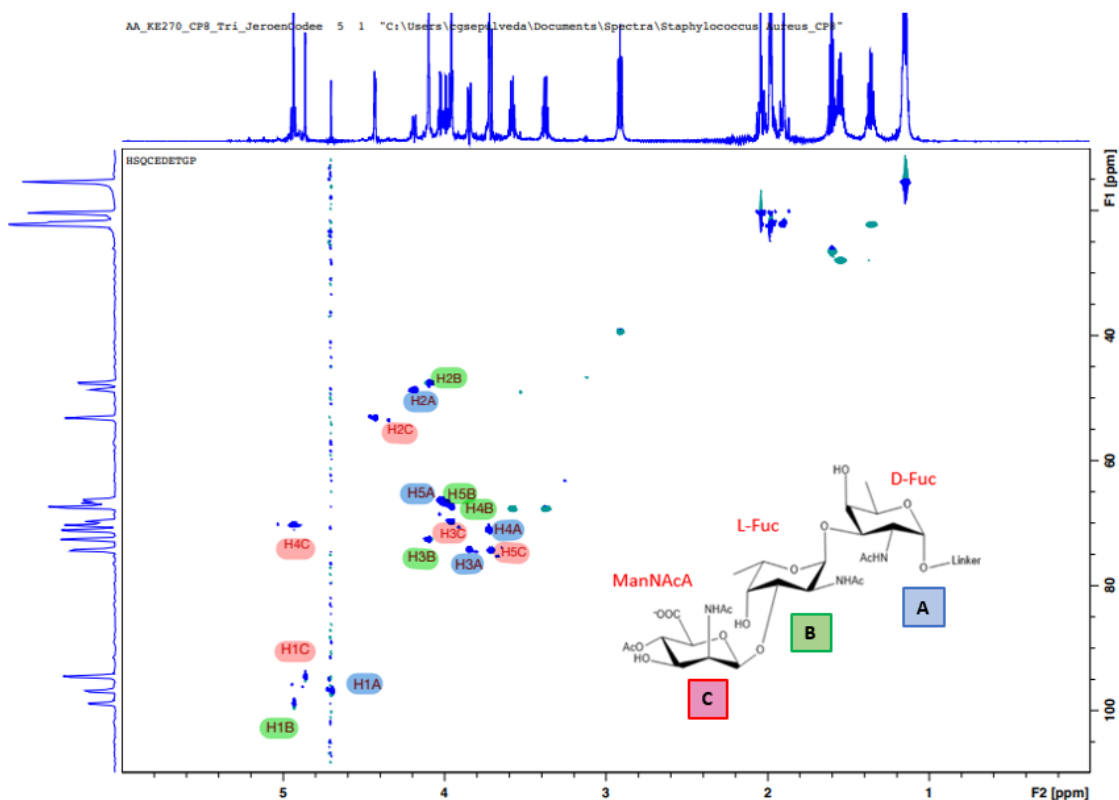


Figura 6.1. Espectro ^1H - ^{13}C -HSQC editado del trisacárido de CP8.

Análisis de las constantes de acoplamiento. Una vez completada la asignación, se llevó a cabo el análisis de las constantes acoplamiento entre los protones de cada uno de los anillos de piranosa para determinar la conformación adoptada por cada uno de los residuos del trisacárido. Los resultados se adjuntan en la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Constantes de acoplamiento $^3J_{\text{H-H}}$, para el trisacárido. N.D: no determinada

$^3J_{\text{H-H}}$ (Hz)	A (D-Fuc)	B (L-Fuc)	C (D-ManNAcA)
H ₁ -H ₂	3.6	N.D (<1.0)	N.D (<1.0)
H ₂ -H ₃	11.6	11.4	4.8
H ₃ -H ₄	3.1	2.4	10.3
H ₄ -H ₅	N.D (<1.0)	N.D (<1.0)	10.3

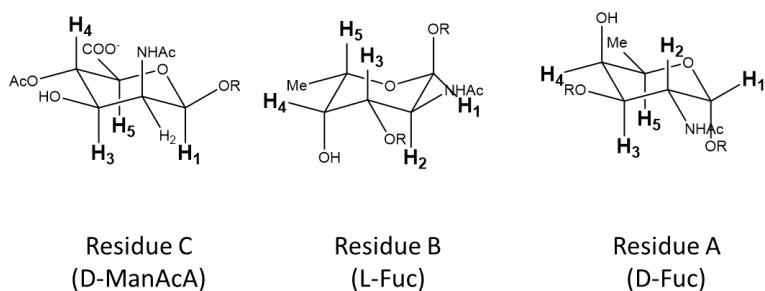


Figura 6.2. Residuos del trisacárido de CP8 de *S. Aureus* en las conformaciones 4C_1 para los residuos C y A y 1C_4 para el residuo B.

Para el residuo A (D-Fuc), los valores de ${}^3J_{H1-H2}$, ${}^3J_{H3-H4}$ y ${}^3J_{H4-H5}$, son pequeños, mientras que ${}^3J_{H2-H3}$ es grande, lo que se corresponde con una conformación 4C_1 (figura 6.2). Para el residuo B (L-Fuc) ${}^3J_{H1-H2}$, ${}^3J_{H3-H4}$ y ${}^3J_{H4-H5}$ son también pequeñas y ${}^3J_{H2-H3}$ grande, lo que se corresponde en este caso con una conformación 1C_4 (el residuo B tiene una configuración opuesta al residuo A). Finalmente, para C (D-ManAcA), los valores de constante de acoplamiento, ${}^3J_{H1-H2}$ y ${}^3J_{H2-H3}$ son pequeños, mientras que ${}^3J_{H3-H4}$ y ${}^3J_{H4-H5}$ son grandes, por lo que se puede concluir que la conformación de ésta es 4C_1 .

Análisis de las señales ROE. Si dos protones se encuentran a una distancia menor de 4 Å, se observará un pico de cruce entre ellos en un espectro NOE. Para el trisacárido a estudiar, sin embargo, el espectro NOE adquirido a 800MHz y 298K mostró señales muy débiles indicando que estas condiciones conllevan una situación de NOE cero, como se ha explicado en la figura 4.2 Debido a ello se adquirió un espectro ROESY, que se usa normalmente para detectar interacciones dipolares entre protones que pertenecen a moléculas de tamaño intermedio, como es el caso del trisacárido. Así, el análisis conformacional de los enlaces glicosídicos entre los residuos C-B y B-A se centró en la identificación de los ROE interresiduo (Figura 6.3).

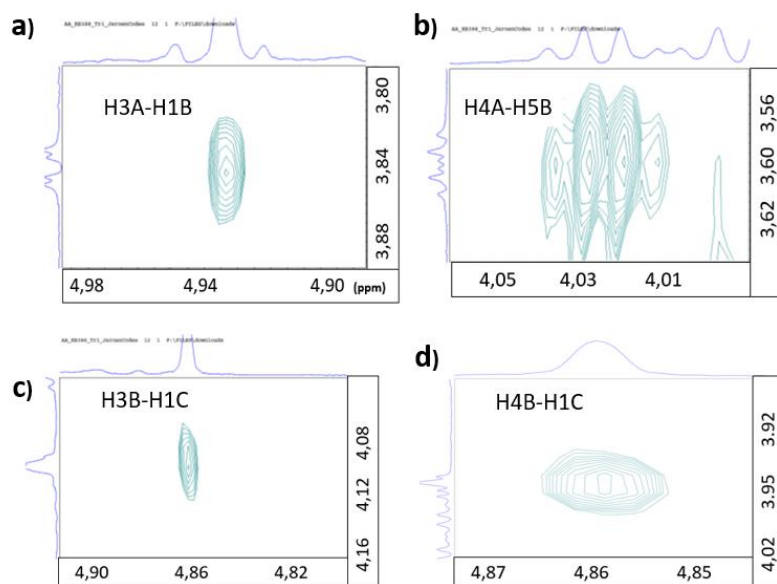


Figura 6.3. Señales ROE interresiduo, claves para la caracterización de la conformación alrededor de los enlaces glicosídicos.

Para cada uno de los dos enlaces glicosídicos se identificaron **dos ROEs interresiduales**, a partir de los cuales se estimó la distancia entre ellos (Tabla 6.2), tal y como se describe en la introducción de esta memoria.

Tabla 6.2. Distancias entre protones interresiduo obtenidas a partir de los ROE: en amarillo las referentes al enlace glicosídico B-A, en azul las referentes al enlace glicosídico C-B.

Par de protones	Distancia de referencia (Å)	Intensidad de ROE	Distancia estimada a partir del ROE (Å)
H1B-H2B	2.5	Fuerte	
H1B-H3A		Fuerte	2.5
H5B-H4A		Fuerte	2.7
H1C-H2C	2.5	Fuerte	
H1C-H3B		Fuerte	2.4
H1C-H4B		Fuerte	2.3

Modelado molecular. La búsqueda conformacional originó 25 posibles conformeros. En algunos de ellos, los enlaces glicosídicos no cumplían el efecto exo-anomérico a pesar de haber restringido la conformación entorno al enlace phi (ϕ). Para cada uno de los enlaces glicosídicos C-B y B-A se seleccionó el conformero que, cumpliendo en efecto exo-anomérico, cumplía también las distancias estimadas experimentalmente a partir de los ROE (Tabla 6.3). Estas conformaciones fueron (ϕ , ψ) $+45\pm 20$, $+48\pm 20$ (es decir, **exo-syn- ϕ /syn(+)- ψ**) para C-B y (ϕ , ψ) $+44\pm 20$, $+20\pm 20$ (es decir **exo-syn- ϕ /syn(+)- ψ**) para B-A. La estructura tridimensional del trisacárido resultante de estos enlaces glicosídicos se muestra en la figura 6.4. Es interesante que los tres grupos acetamido se orientan hacia el mismo lado de la molécula, mientras que los tres grupos metilos se organizan en el lado opuesto en un plano de 180° , quedando el grupo carboxílico del residuo C perpendicular a este plano.

Tabla 6.3. Comparativa entre las distancias interprotónicas obtenidas mediante ROE y métodos computacionales.

Par de protones	Distancia estimada a partir del ROE (Å)	Distancia en modelo (Å)
H1B-H3A	2.5	2.4
H5B-H4A	2.7	2.8
H1C-H3B	2.4	2.7
H1C-H4B	2.3	2.1

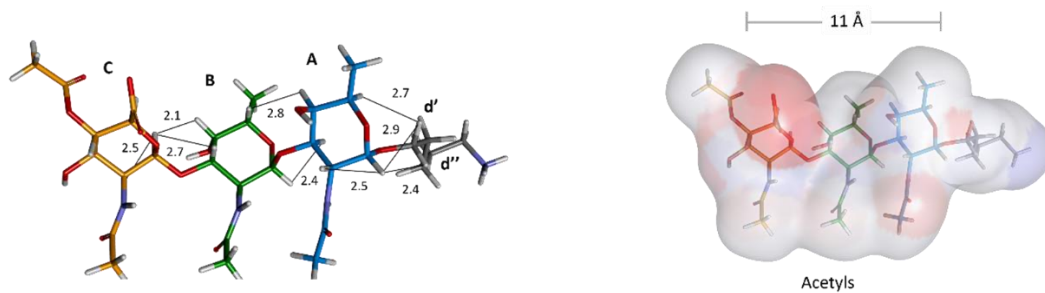


Figura 6.4. Estructura tridimensional del trisacárido de CP8 de *S. Aureus*, deducida por RMN y modelado molecular. A la izquierda, representación en barras con las distancias interprotónicas determinadas por ROE señaladas. A la derecha, representación con superficie.

Análisis conformacional del nonasacárido

CP8. La asignación de los espectros del nonasacárido fue compleja, y estuvo facilitada por el trabajo previo con el trisacárido. El espectro ^1H - ^{13}C -HSQC asignado se muestra en las figuras 6.5 y 6.6.

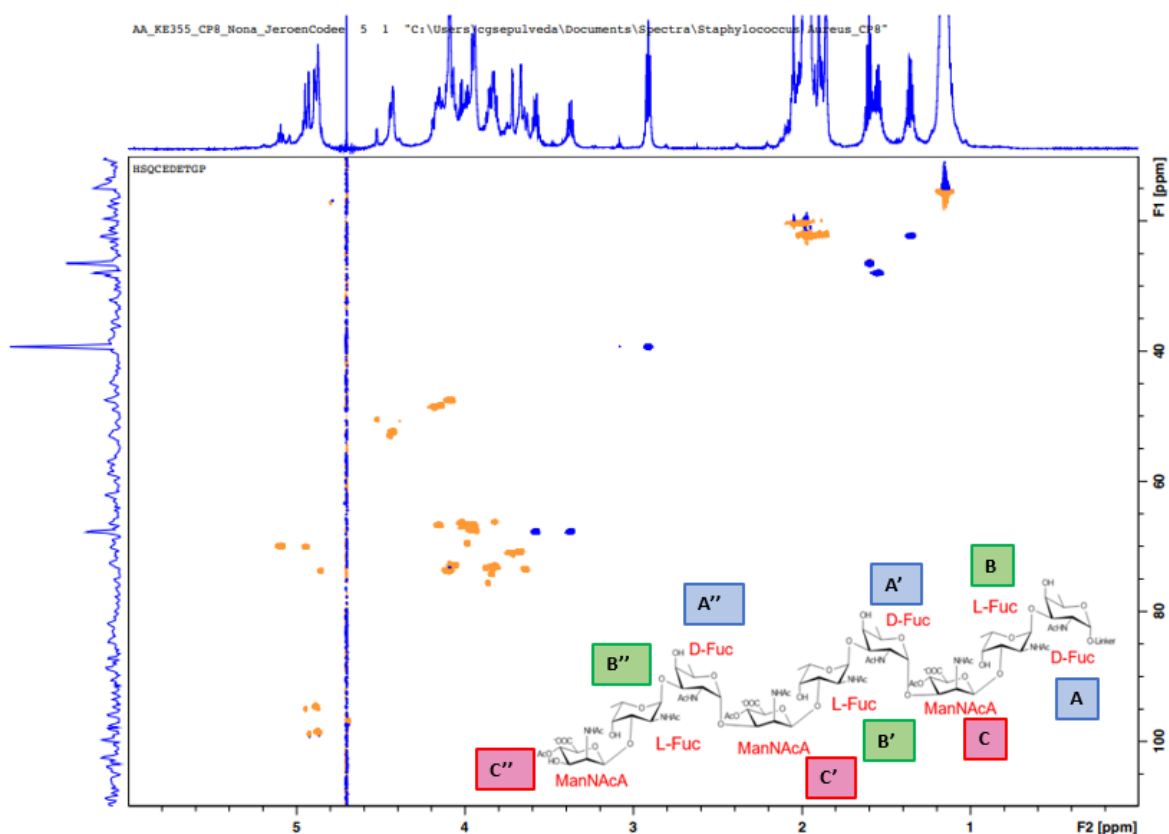


Figura 6.5. Espectro ^1H - ^{13}C -HSQC editado del nonasacárido de CP8.

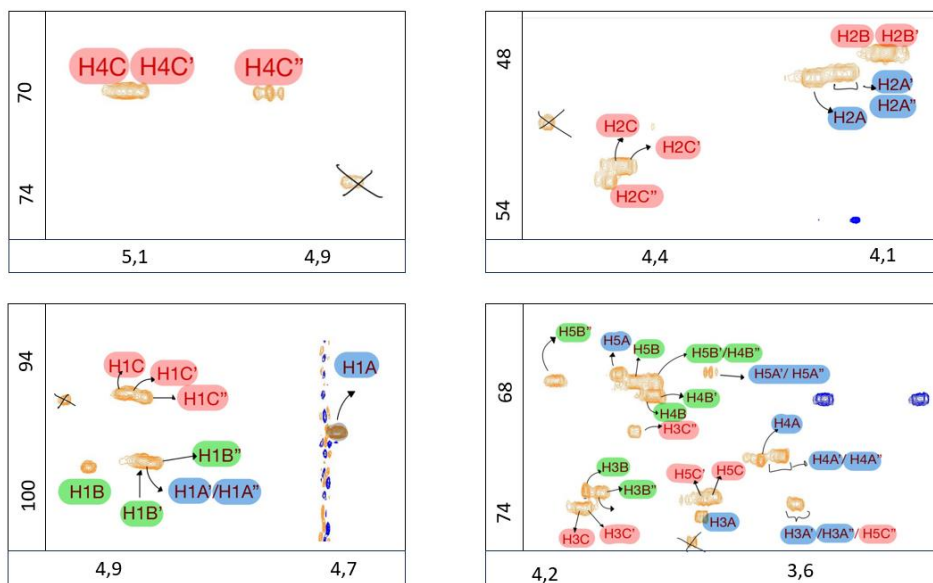


Figura 6.6. Ampliaciones del espectro ^1H - ^{13}C -HSQC editado del nonasacárido de CP8.

En este caso, no se pudo realizar un análisis de las constantes de acoplamiento debido a solapamiento de las señales de ^1H . Por la misma razón, el análisis de los NOE se vio complicado, de tal manera que los NOEs se clasificaron solamente en fuerte, débil o medio (sin estimar distancias), mientras que algunos no se pudieron ni asignar. En la figura 6.7 se muestran diferentes regiones del espectro NOESY, con algunos de los NOE interresiduales anotados.

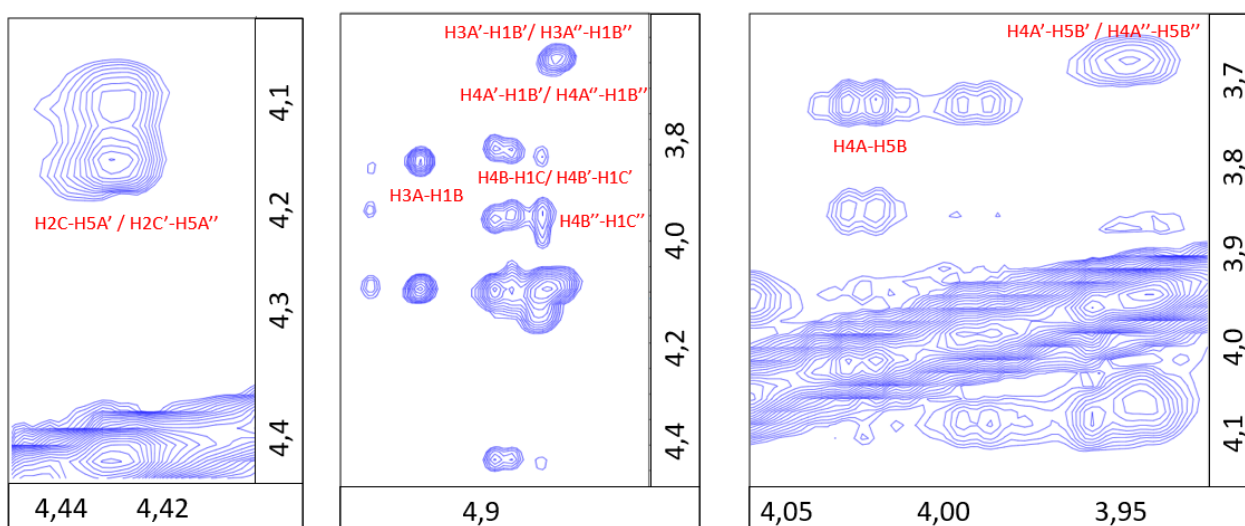


Figura 6.7. Señales NOE interresiduo del nonasacárido de CP8, claves para la caracterización de la conformación alrededor de los enlaces glicosídicos.

En la tabla 6.4, se recogen los NOE interprotónicos interresiduales relevantes para definir la conformación entorno a cada uno de los enlaces glicosídicos del nonasacárido.

Tabla 6.4. Distancias entre protones interresiduo obtenidas a partir de los NOE para el nonasacárido.

Enlace glicosídico	Par de protones	Intensidad de NOE
B-A	H1B-H3A	Fuerte
	H5B-H4A	Medio/Fuerte
C-B	H1C-H3B	Fuerte
	H1C-H4B	Medio/Fuerte
A'-C	H1A'-(OAc)C	Débil
	H5A'-H2C	Fuerte
	H1A'-H2C	Ausente
B'-A'	H1B'-H3A'	Fuerte
	H1B'-H4A'	Ausente
	H5B'-H4A'	Débil
C'-B'	H1C'-H4B'	Fuerte
	H1C'-H3B	Medio/Fuerte
A''-C'	H1A''-H2C'	Ausente
	H1A''-H4C'	Ausente
	H5A''-H2C'	Fuerte
B''-A''	H1B''-H3A''	Fuerte
	H1B''-H4A''	Ausente
	H1B''-H2A''	Ausente
	H5B''-H4A''	Fuerte
C''-B''	H1C''-H4B''	Fuerte
	H1C''-H3B''	Medio/Fuerte

Estos resultados de NOEs se combinaron con el análisis conformacional llevada a cabo por modelado molecular. Así, se pudo concluir que las conformaciones **exo-syn- ϕ /syn(+)- ψ** predominan entorno a los enlaces glicosídicos **L-FucNAc(α 1-3)-D-FucNAc** (B-A, B'-A' y B''-A'') y **ManNAcA(β 1-3)-L-FucNAc** (C-B, C'-B' y C''-B''), exactamente igual que en el trisacárido. Por su parte, para el enlace glicosídico D-FucNAc(α 1-3)-ManNAcA (A''-C' y A'-C) se da exclusivamente la conformación **exo-syn- ϕ /syn(-)- ψ** , como se deduce de la presencia de los NOEs H1D-FucNAc(residuos A', A'')-H3ManNAc(residuos C, C') y H5D-FucNAc(residuos A', A'')-H2ManNAc(residuos C, C'). Las geometrías alternativas anti- ψ y syn(+)- ψ se pueden descartar con seguridad debido a los choques estéricos de la acetamida de la D-FucNAc con el grupo OAc o los grupos acetamida de la ManNAc contigua. Como resultado, el nonasacárido adopta una estructura tridimensional extendida con una longitud promedio de ~ 35 Å, que básicamente corresponde a tres veces la longitud del trisacárido. Aquí, cada unidad de repetición (RU) presenta los grupos Ac orientados en la misma dirección e inclinados en un ángulo diedro cercano a los 90° entre dos RU consecutivas (figura 6.8). La estrecha proximidad de los grupos metilo de los N- y O-acetilo crea parches hidrofóbicos que pueden desempeñar un papel en la inmunogenicidad del polisacárido capsular de *S. Aureus*. Las cargas negativas de los restos de carboxilato están a una distancia de 15-16 Å entre sí.

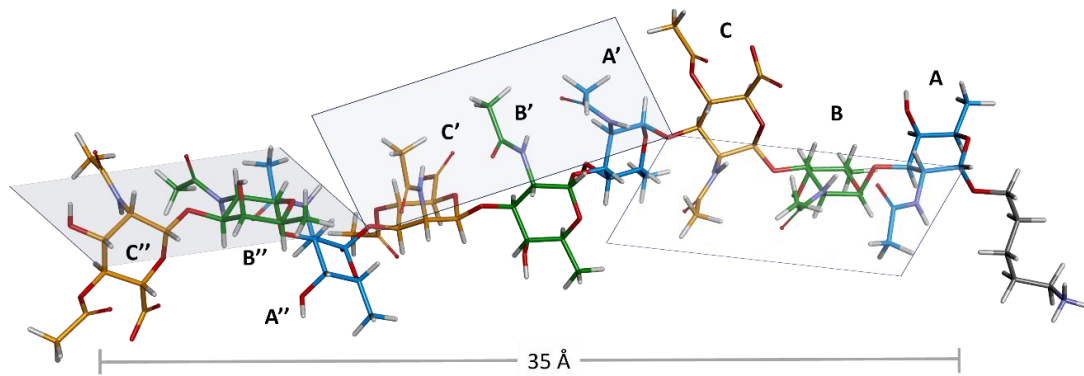


Figura 6.8. Modelo para la estructura tridimensional del nonasacárido CP8 de *S. Aureus*, deducida por RMN y modelado molecular.

6.4. Conclusiones.

Se ha llevado a cabo el estudio conformacional de un trisacárido y un nonasacárido que se corresponden con una y tres unidades de repetición (RUs) respectivamente del polisacárido capsular CP8 de *S. Aureus*.

En el caso del trisacárido, se ha determinado la conformación del anillo de piranosa de cada uno de los tres residuos mediante el análisis de las constantes de acoplamiento $^3J(H,H)$, así como a partir de los NOE intraresiduo. Así, el anillo de L-Fuc adopta la conformación 1C_4 , mientras que la D-Fuc y el D-ManNAcA, adoptan la conformación 4C_1 .

La conformación entorno a los enlaces glicosídicos se ha determinado combinando datos obtenidos mediante RMN con métodos computacionales. Así, se ha podido concluir que el enlace entre los **residuos C y B** adopta preferentemente una conformación $(\phi, \psi) +45\pm 20, +48\pm 20$ (**exo-syn- ϕ /syn(+)- ψ**), mientras que **entre los residuos B y A** se da mayoritariamente la conformación $(\phi, \psi) +44\pm 20, +20\pm 20$ (**exo-syn- ϕ /syn(+)- ψ**). La combinación de estas conformaciones da lugar a una forma global para el trisacárido en la que los tres grupos acetamido se orientan hacia la misma dirección, mientras que los grupos metilos se disponen en el lado opuesto, en un plano de 180° , quedando el carboxilato presente en D-ManNAcA, perpendicular a dicho plano. La estructura tridimensional extendida tiene una longitud de ~ 11 Å.

Para el nonasacárido, las conformaciones **exo-syn- ϕ /syn(+)- ψ** son mayoritarias entorno a los enlaces glicosídicos **L-FucNAc(α 1-3)-D-FucNAc** (B-A, B'-A' y B''-A'') y **ManNAcA(β 1-3)-L-FucNAc** (C-B, C'-B' y C''-B''), exactamente igual que en el trisacárido. Por otra parte, para el enlace glicosídico D-FucNAc(α 1-3)-ManNAcA (A''-C' y A'-C) se da exclusivamente la conformación **exo-syn- ϕ /syn(-)- ψ** . Dicho oligosacárido adopta una estructura tridimensional también extendida, con una longitud de ~ 35 Å, en la que los grupos acetamido se encuentran orientados en la misma dirección, inclinados 90° entre dos unidades de repetición consecutivas y donde las cargas negativas de los carboxilatos se encuentran a una distancia de 15-16 Å entre sí.

7. Bibliografía.

1. Canal-Martín, A; Pérez-Fernández, R; Protein-Directed Dynamic Combinatorial Chemistry: An Efficient Strategy in Drug Design ; *ACS Omega* 2020, **41**, 5, 26307-26315. DOI: [10.1021/acsomega.0c03800](https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03800)
2. Fang, Z; He, W; Li, X; Li, Z; Chen, B; Ouyang, P; Guo, K. A novel protocol to accelerate dynamic combinatorial chemistry via isolation of ligand–target adducts from dynamic combinatorial libraries: A case study identifying competitive inhibitors of lysozyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23, 18, 5174–5177. DOI:[10.1016/j.bmcl.2013.07.011](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.07.011)
3. Mondal, M; Hirsch, A. K. H. Dynamic combinatorial Chemistry: a tool to facilitate the identification of inhibitors for protein targets. *Chem. Soc. Rev*, **2015**, 44, 2455–2488. DOI: [10.1039/C4CS00493K](https://doi.org/10.1039/C4CS00493K)
4. Frei, P; Hevey, R; Ernst, B; Dynamic combinatorial chemistry: anew methodology comes of age; *Chem. - Eur. J*, **2019**, 25, 60–73. DOI: [10.1002/chem.201803365](https://doi.org/10.1002/chem.201803365)
5. Chipman, D. M; Sharon, N; Mechanism of Lysozyme Action; *Science*, **1969**, 382 ,165, 454–465. DOI: [10.1126/science.165.3892.454](https://doi.org/10.1126/science.165.3892.454)
6. Ferraboschi, P; Ciceri, S; Grisenti, P; Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic; *Antibiotics*, **2021**, 10, 1534. DOI: doi.org/10.3390/antibiotics10121534
7. Ganz, T; LYSOZYME. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, **2006**, 649–653. DOI:[10.1016/b0-12-370879-6/00228-3](https://doi.org/10.1016/b0-12-370879-6/00228-3)
8. Hirakawa, H; Ochi, A; Kawahara, Y; Kawamura, S; Torikata, T; Kuhara, S; Catalytic reaction mechanism of goose egg-white lysozyme by molecular modelling of enzyme-substrate complex; *J Biochem*, **2008**, 144, 6, 753-761. DOI:[10.1093/jb/mvn133](https://doi.org/10.1093/jb/mvn133)
9. Muller, S; Wolf, A.J; Iliev I.D; Berg, B.L; Underhill, D.M; Liu, G.Y; Poorly Cross-Linked Peptidoglycan in MRSA Due to mecA Induction Activates the Inflammasome and Exacerbates Immunopathology, *Cell Host Microbe*, **2015**, 18, 5: 604–12. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.011>
10. Abdou, A.M.; Higashiguchi, S.; Aboueleinin, A.M.; Kim, M.; Ibrahim, H.R. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against Bacillus species. *Food Cont*, **2007**, 18, 173–178.
11. Carneiro, I.D.S.; de Menezes, J.N.R.; Maia, J.A.; Miranda, A.M.; de Oliveira, V.B.S.; Murray, J.D.; Maga, E.A.; Bertolini, M.; Bertolini, L.R. Milk from transgenic goat expressing human lysozyme for recovery and treatment of gastrointestinal pathogens. *Eur. J. Pharm. Sci*, **2018**, 112, 79–86
12. Aminlari, L.; Hashemi, M.M.; Aminlari, M. Modified Lysozymes as Novel Broad Spectrum Natural Antimicrobial Agents in Foods, *J. Food Sci*, **2014**, 79, 1077–1090.
13. Redfield, C; Dobson, C.M; Sequential ¹H NMR Assignments and Secondary Structure of Hen Egg White Lysozyme in Solution¹, *Biochemistry* , **1988**, 27, 122-136.
14. Hagen,B; Ali,S; Overkleeft, H. S; van der Marel, G. A; Codée, J. D. C; Mapping the Reactivity and Selectivity of 2-Azidofucosyl Donors for the Assembly of N-Acetylfucosamine-Containing Bacterial Oligosaccharides; *J. Org. Chem*, **2017**, 82, 848–868. DOI: [10.1021/acs.joc.6b02593](https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02593)
15. Berni, F; Enotarpi, J; Voskuilen, T; Li, S; van der Marel,G; Codée, J; Synthetic carbohydrate-based cell wall components from Staphylococcus aureus. *Drug Discovery Today: Technologies*, **2020**, 38, 35-43.
16. Lowy, F.D; Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med*, **1998**; 339, 520–32; DOI: [10.1056/NEJM199808203390806](https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806)

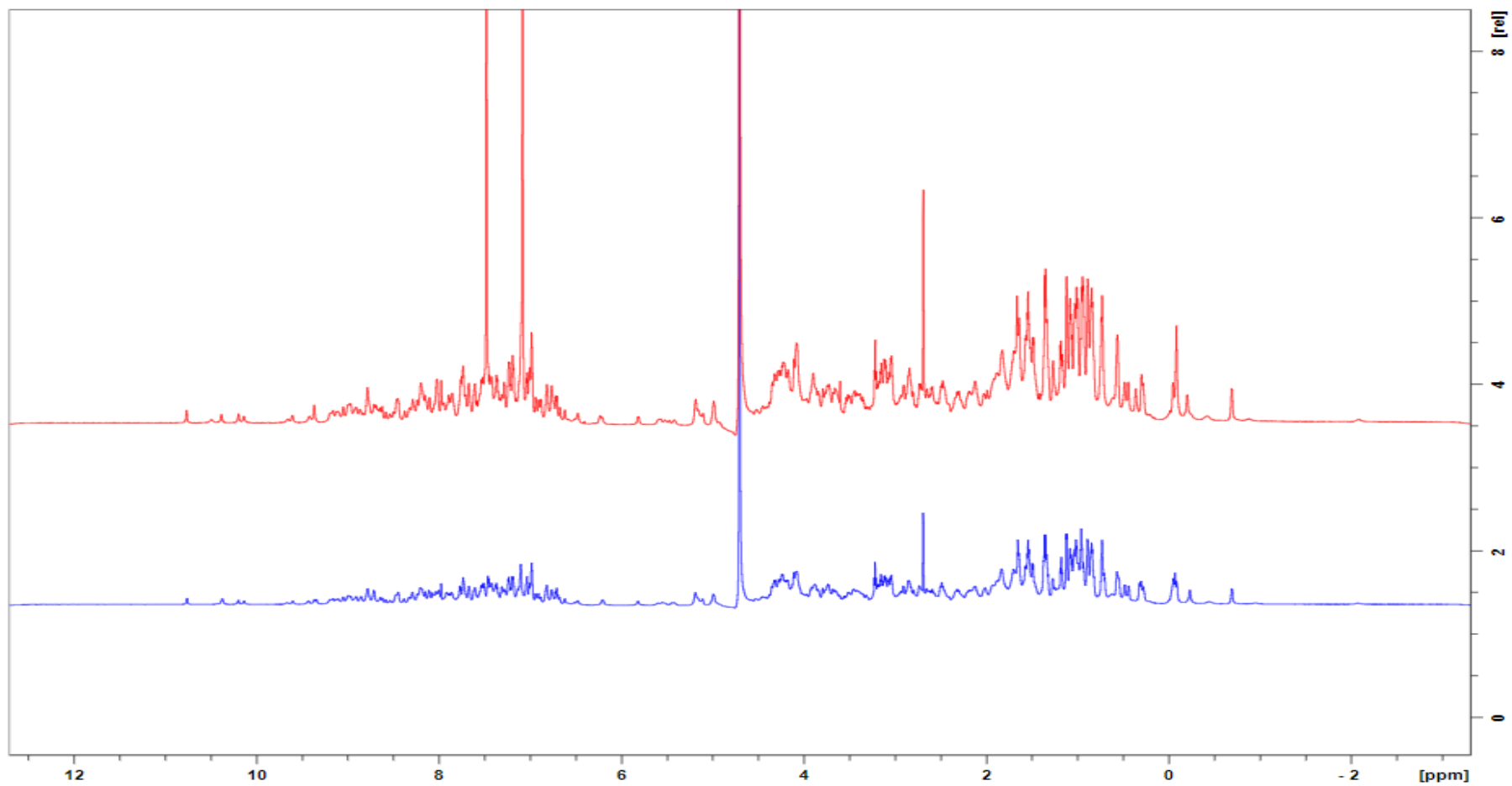
17. Vollmer, W; Blanot, D; De Pedro, M; Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, **2008**, 32, 2, 149-167. DOI: [10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x)
18. Karakawa, W,W; Sutton, A; Schneerson ,R; Karpas, A; Vann, W.F; Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorpho nuclear leukocytes. *Infect Immun*, **1988**, 56 ,1090–1095. DOI: [10.1128/iai.56.5.1090-1095.1988](https://doi.org/10.1128/iai.56.5.1090-1095.1988)
19. Roghmann, M ;Taylor, K. L; Gupte, A; Zhan, M; Johnson, J.A; Cross, A; Epidemiology of capsular and Surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. *J Hosp Infect*, **2005**; 59, 27–32. DOI: [10.1016/j.jhin.2004.07.014](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.07.014)
20. Flynn, R. A; Pedram, K; Malaker, S. A; Batista, P. J; Smith, B.A. H; Johnson, A. G; George, B. M; Majzoub, K; Villalta, P. W; Carette, J. E; Small RNAs Are Modified with N-Glycans and Displayed on the Surface of Living Cells, *Cell*, **2021**, 184, 3109–3124. DOI: [10.1016/j.cell.2021.04.023](https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.023)
21. Varki, A; Prestegard, J. J; Schnaar, R. L; Seeberger, P. H; Cummings, R. D; Esko, J. D; Hart, G. W; Aebi, M., Mohnen, D; Kinoshita,T; Essentials of Glycobiology, 4th ed.; Cold Spring Harbor: New York, 2022.
22. Kamerling, J. P; Basics Concepts and Nomenclature Recommendations in Carbohydrate Chemistry. In *Comprehensive Glycoscience* ; Ed; Elseiver, 2007; Vol.1, pp 1–38.
23. Silva, A. M; Da Silva, E. C; Da Silva, C. O; *Carbohydrate Research*, **2006**, 341, 1029-1040. DOI: [10.1016/j.carres.2006.02.035](https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.02.035)
24. Zhu, Y.; Zajicek, J.; Serianni, A. S. Acyclic Forms of [1-¹³C]Aldohexoses in Aqueous Solution: Quantitation by ¹³C NMR and Deuterium Isotope Effects on Tautomeric Equilibria, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6244–6251
25. Angyal, S. J.; Pickles, V. A. Equilibria between Pyranoses and Furanoses: II. Aldoses. *Aust. J. Chem.* **1972**, 25, 1695–1710.
26. Lemieux, R. U; Effects of Unshared Pairs of Electrons and Their Solvation on Conformational Equilibria. *Pure Appl. Chem*, **1971**, 25, 527-548
27. Angyal, S.J; The Composition and Conformation of Sugars in Solution, *Angew. Chem. internat. Edit*, **1969**, 8, 3, 157-226. DOI:[10.1002/anie.196901571](https://doi.org/10.1002/anie.196901571)
28. Squillacote, M; Sheridan, R. S; Chapman, O. L; Anet, F. A; *J. Am. Chem. Soc*, **1975**, 97, 3244-3246. DOI: [10.1021/ja00844a068](https://doi.org/10.1021/ja00844a068)
29. Gerbst, A. G; Krylov, V. B; Nifantiev, N. E; Conformational Changes in Common Monosaccharides Caused by Per-O-Sulfation. *Pure Appl.Chem*, **2019**, 91, 1223–1229. DOI: [10.1515/pac-2018-1212](https://doi.org/10.1515/pac-2018-1212).
30. Bock, K; Duus, J; A Conformational Study of Hydroxymethyl Groups in Carbohydrates Investigated by ¹H NMR Spectroscopy; *J. Carbohydr. Chem*, **1994**, 13, 513-543 DOI: [10.1080/07328309408011662](https://doi.org/10.1080/07328309408011662)
31. Stenutz, R; Carmichael, I; Widmalm, G; Serianni, A.S; Hydroxymethyl Group Conformation in Saccharides: Structural Dependencies of ²J^{HH}, ³J^{HH}, and ¹J^{CH} Spin–Spin Coupling Constants, *J. Org. Chem*, **2002**, 67, 3, 949–958. <https://doi.org/10.1021/jo010985i>
32. Asensio, J. L; Cañada, F. J; García-Herrero, A; Murillo, M.T; Fernández-Mayoralas, A; Johns, B. A; Kozak, J; Zhu, Z; Johnson, C. R; Jiménez-Barbero, J; Conformational Behavior of Aza-C-Glyco-sides: Experimental Demonstration of the Relative Role of the exo-anomeric Effect and 1,3-Type Interactions in Controlling the Conformation of Regular Glycosides; *J. Am. Chem. Soc*, **1999**, 121, 11318-11329.
33. Freibolin, H. Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy, 4th ed.; Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2005; p 135.

34. Viegas, A; Manso, J; Nobrega, F.L.; Cabrita, E. J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.*, **2011**, *88*, 7, 990–994. [DOI:10.1021/ed101169t](https://doi.org/10.1021/ed101169t)
35. Unione, L., Galante, S., Díaz, D., Cañada, F. J., & Jiménez-Barbero, J. NMR and molecular recognition. The application of ligand-based NMR methods to monitor molecular interactions. *Med. Chem. Commun.*, **2014**, *5*, 9, 1280–1289. [DOI:10.1039/c4md00138a](https://doi.org/10.1039/c4md00138a)
36. Meyer, B; Peters, T; NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors, *Angew. Chem.*, **2003**, *42*, 8, 864–890. [DOI:10.1002/anie.200390233](https://doi.org/10.1002/anie.200390233)
37. Williamson, Mike P; Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding; *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2013**, *73*, 1–16. [DOI:10.1016/j.pnmrs.2013.02.001](https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2013.02.001).
38. Zuiderweg, E.R.P; Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 1-7. [DOI: 10.1021/bi011870b](https://doi.org/10.1021/bi011870b)
39. Duus, J; Gotfredsen, C; Bock, K; Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4589–4614 [DOI:10.1021/cr990302n](https://doi.org/10.1021/cr990302n)
40. Taha, H. A.; Richards, M. R.; Lowary, T. L. Conformational Analysis of Furanoside-Containing Mono- and Oligosaccharides, *Chem. Rev.*, **2013**, *113*, 1851–1876. [DOI:10.1021/cr300249c](https://doi.org/10.1021/cr300249c)
41. Haasnoot, C. A. G., de Leeuw, F. A. A. M., & Altona, C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities—I, *Tetrahedron*, **1980**, *36*, 19, 2783–2792. [DOI:10.1016/0040-4020\(80\)80155-4](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)80155-4).
42. Jensen, F; Introduction to Computational Chemistry. John Wiley & Sons, **1999** Chichester, England
43. <http://dll.arizona.edu/courses/CHEM518private/conformations/SchodingerApproach.php.pdf> (Visto en agosto de 2023)
44. <https://ccpn.ac.uk/software/downloads/3-0-4/> (Visto en agosto de 2023)
45. <https://www.rcsb.org/structure/1e8l>. <https://doi.org/10.2210/pdb1E8L/pdb> (Visto en agosto de 2023)

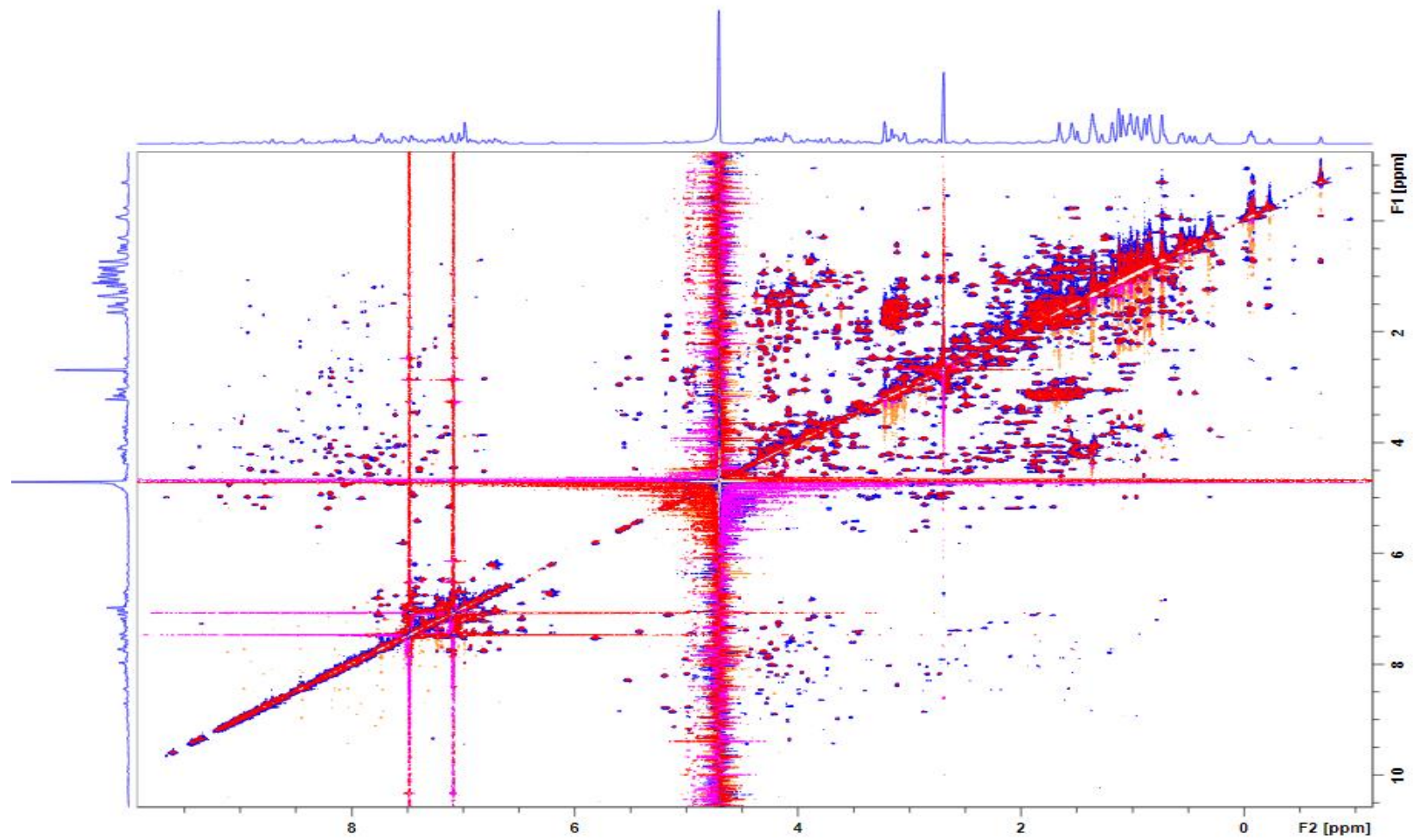
Anexo I: Desplazamientos químicos de la Lisozima libre.

	NH	H α	H α	H β		H γ		H δ		H ϵ	H ζ	
2-Val	8,9447	4,9979		2,0252		1,0806	0,9778					
3-Phe	8,9134	4,2243		3,2126	2,7000	6,9981				7,2062	7,4729	
4-Gly	8,5497	4,3705	3,9931									
5-Arg	8,4887	3,4115		2,1327	1,8445	1,7027		3,1710		7,3633		
6-Cys	8,7933	4,7522		2,8360	3,2113							
7-Glu	8,1867	4,1099		2,1879	2,3389							
8-Leu	8,5951	3,8002		0,9513	1,6087	1,4703		0,5074	-0,0101			
9-Ala	8,4576	3,6193		1,5851								
10-Ala	8,1626	3,9786		1,5601								
11-Ala	7,8971	4,2805		1,4813								
12-Met	9,0671	3,5741								no asignado		
13-Lys	8,4586	4,0082		2,1927	1,9489	1,5145		3,1817				
14-Arg	8,2191	4,1892		1,7536	1,8574	1,5154		3,0506				
15-His	7,4057	4,4655		2,3694	3,6901							
16-Gly	7,6768	4,1130	3,9557									
17-Leu	7,2046	3,9129		0,2259		0,7441		-0,6730	-0,0722			
18-Asp	8,7149	4,2926		2,4222	3,0202							
19-Asn	8,4688	3,9443		3,0669	2,8857							
20-Tyr	8,0311	4,2503		3,0974	3,2612			7,2048		6,9250		
21-Arg	8,9987	3,6545		1,9432								
22-Gly	7,6213	3,5072	3,8960									
23-Tyr	7,6864	4,5544		3,3362	2,5123			7,0494		6,7288		
24-Ser	8,8935	4,5172										
25-leu	9,0033	4,4361				1,6176		1,0084	0,8732			
26-Gly	9,4445	4,1984										
27-Asn	8,2479	4,2785		2,3909	2,8532							
28-Trp	7,1614	3,7391		3,2194	3,2846	9,3553		7,3014	6,7647	6,2235	6,7794	7,4432
29-Val	7,4658	3,4673		1,9502		1,2866	0,9462					
30-Cys	8,0258	2,5041		2,5992	2,9336							
31-Ala	8,0859	3,7428		0,9952								
32-Ala	7,6186	3,9122		1,3574								
33-Lys	7,9215	2,5932										
34-Phe	7,3604	4,3212		2,3369	3,1793			7,2508		7,3813	7,5137	
35-Glu	8,7210	4,5358		1,9375								
36-Ser	8,0134	4,5477		3,6685	diagonal							
37-Asn	8,1276	4,5451		2,4865	3,3589							
38-Phe	7,4351	3,8929		3,6703	3,8060			7,0222		7,5156	7,0762	
39-Asn	7,4236	5,4336		2,8759	3,4785							
40-Thr	9,3700	4,0895		4,6211		1,6536						
41-Gln	7,8609	4,4586		2,4687	1,8977							
42-Ala	6,8970	4,1650		1,3870								
43-Thr	8,2229	5,2041		3,7323		1,1018						
44-Asn	8,1867	5,0070		2,7334								
45-Arg	8,8024	4,5296		1,8345	1,7165							
46-Asn	8,8736	5,1354		2,8895								
47-Thr	8,7274	4,1251		4,3843		1,3715						
48-Asp	7,8458	4,5819		2,6971	3,0998							
49-Gly	7,8823	3,7680	4,4124									
50-Ser	8,3362	4,5833										
51-Thr	9,1927	4,9852		3,7819		0,3170						
52- Asp	8,8027	5,1973		2,0423	2,1300							
53-Tyr	9,1138	4,7789		2,6613	2,9940			7,1629		6,8367		
54-Gly	8,9992	4,3319	4,4917									
55-Ile	8,9145	4,3511		1,6848		1,5758	1,0459	0,8975		0,6934		
56-Leu	8,9040	4,4869		1,5591	1,8425	1,2439		0,2918	0,5594			
57-Gln	7,9350	3,4069		2,0221	2,1554							
58-Ile	7,6757	4,0048		1,7593		1,8316		1,0616		0,9756		
59-Asn	8,8586	5,6141		2,9688	3,4275							
60-Ser	9,1440	5,1202										
61-Arg	8,7776	4,0819		1,5047	1,7203							
62-Trp	7,0977	4,4732		3,4369	2,5873	10,2127		7,1166		7,0567	7,2068	7,4706
63-Trp	7,4535	4,9685		3,3098	3,4519				7,7787	6,8324	7,1102	7,2452
64-Cys	7,5461	5,8253		2,5673	3,0343							
65-Asn	8,3059	5,5342		2,8591	2,4732							
66-Asp	9,6722	5,0040		2,2633	3,2723							
67-Gly	8,3373	4,1497	3,8736									
68-Arg	No asignado											
69-Thr	8,1977	4,6066		4,1902		0,9111						

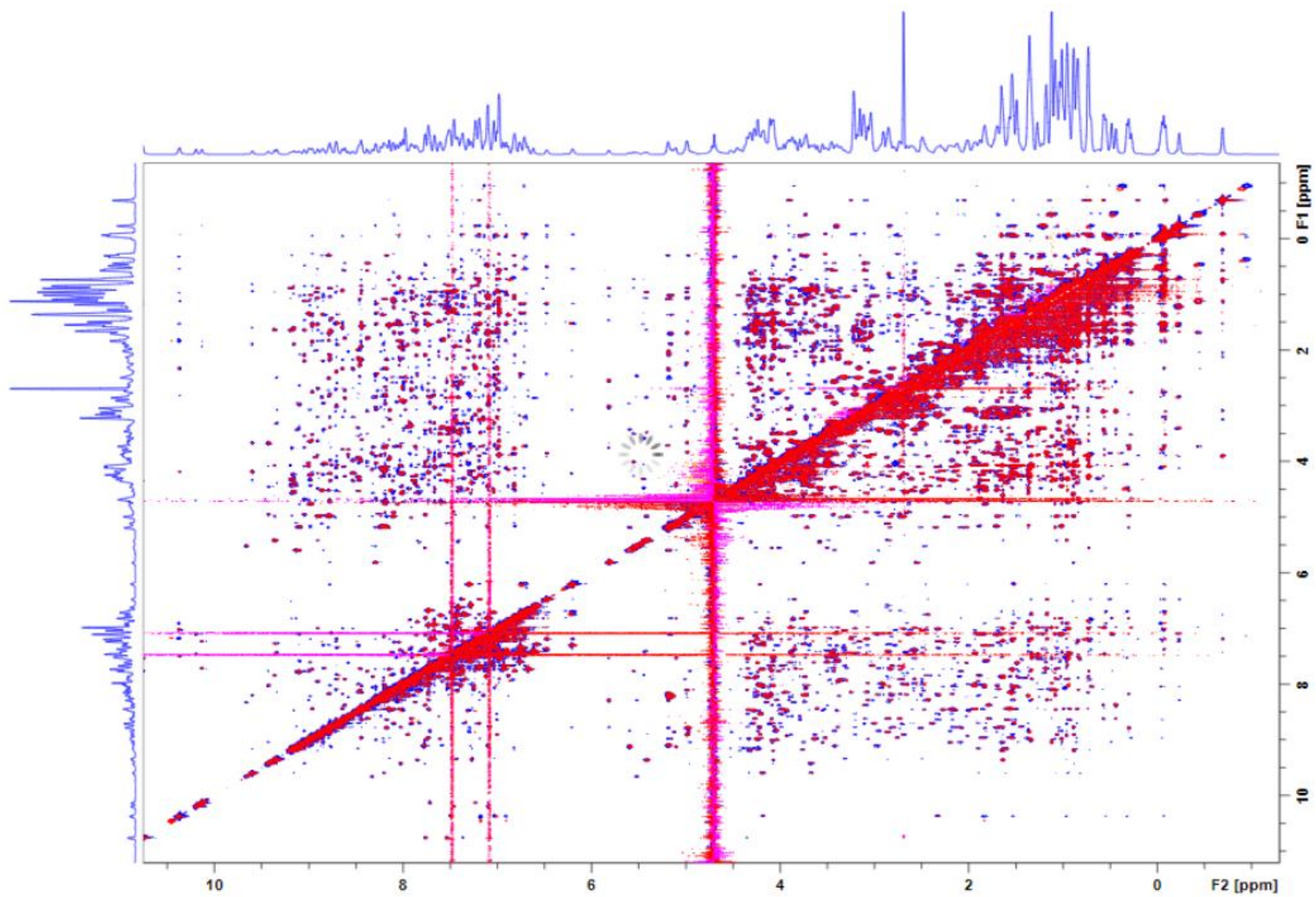
Anexo II: Espectros ^1H -NMR. En rojo (HWEL + H18). En azul (HWEL libre)



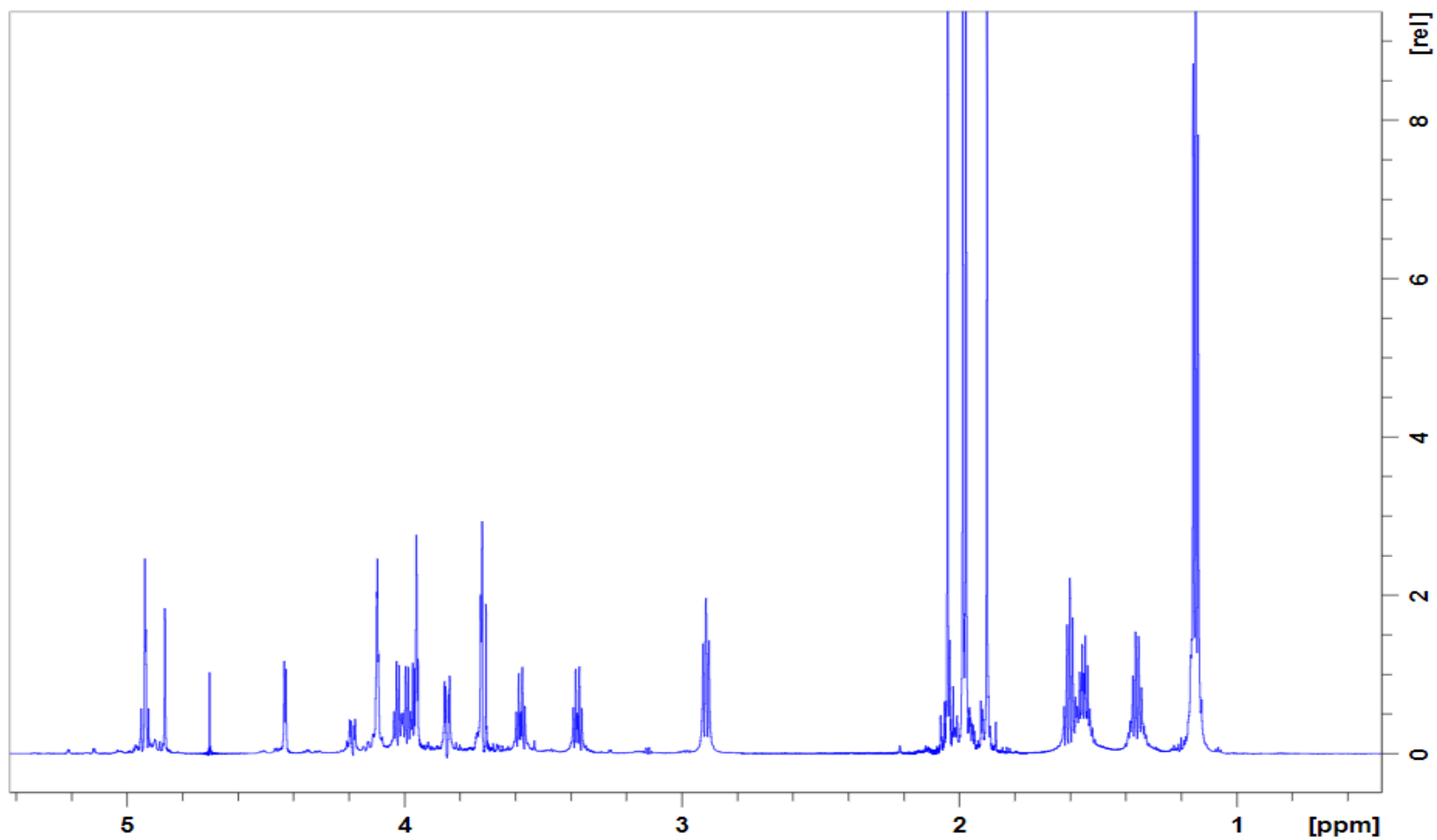
Anexo III: Espectros TOCSY superpuestos . En rojo (HWEL + H18). En azul (HWEL libre)



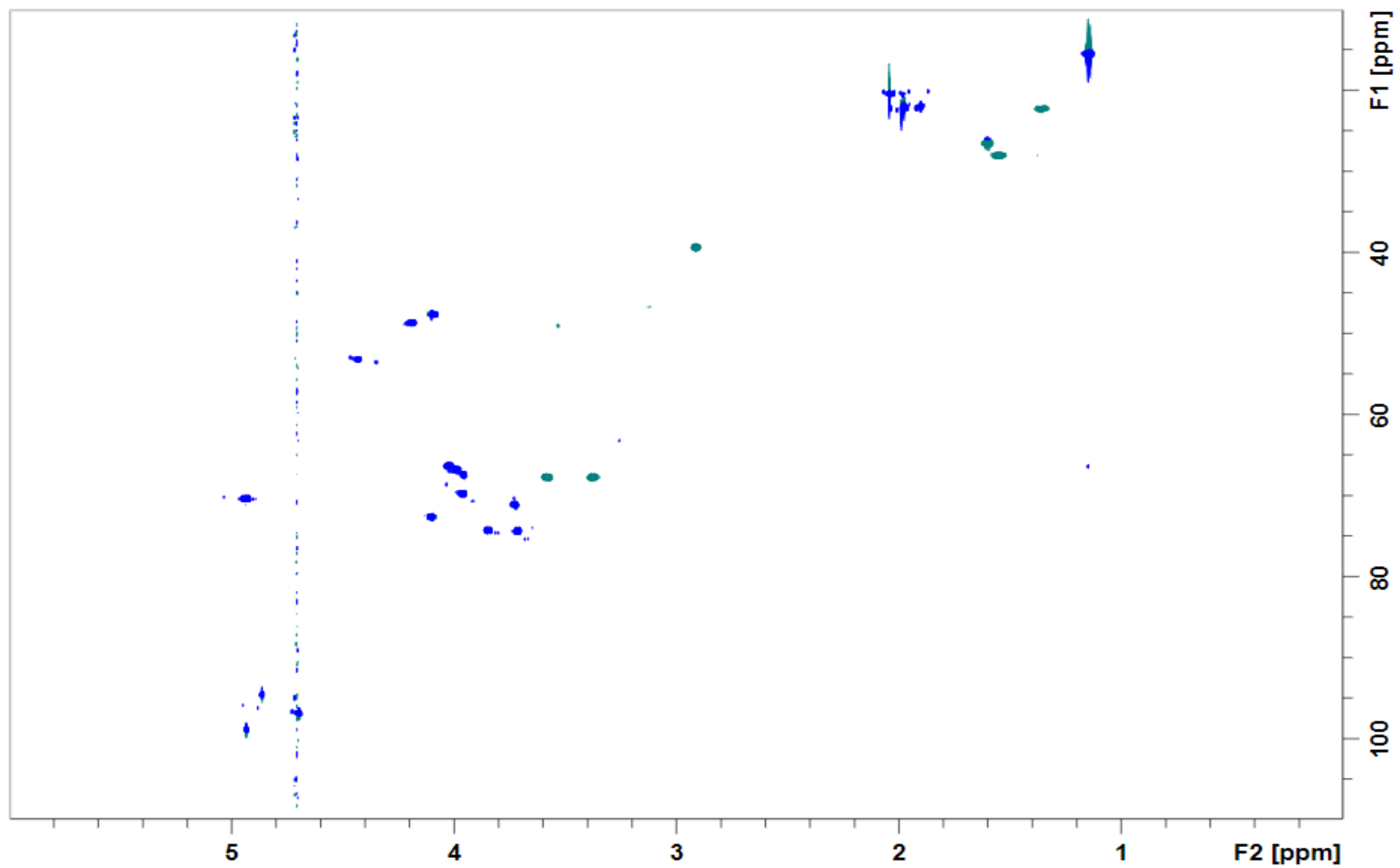
Anexo IV: Espectros NOESY superpuestos . En rojo (HWEL + H18). En azul (HWEL libre)



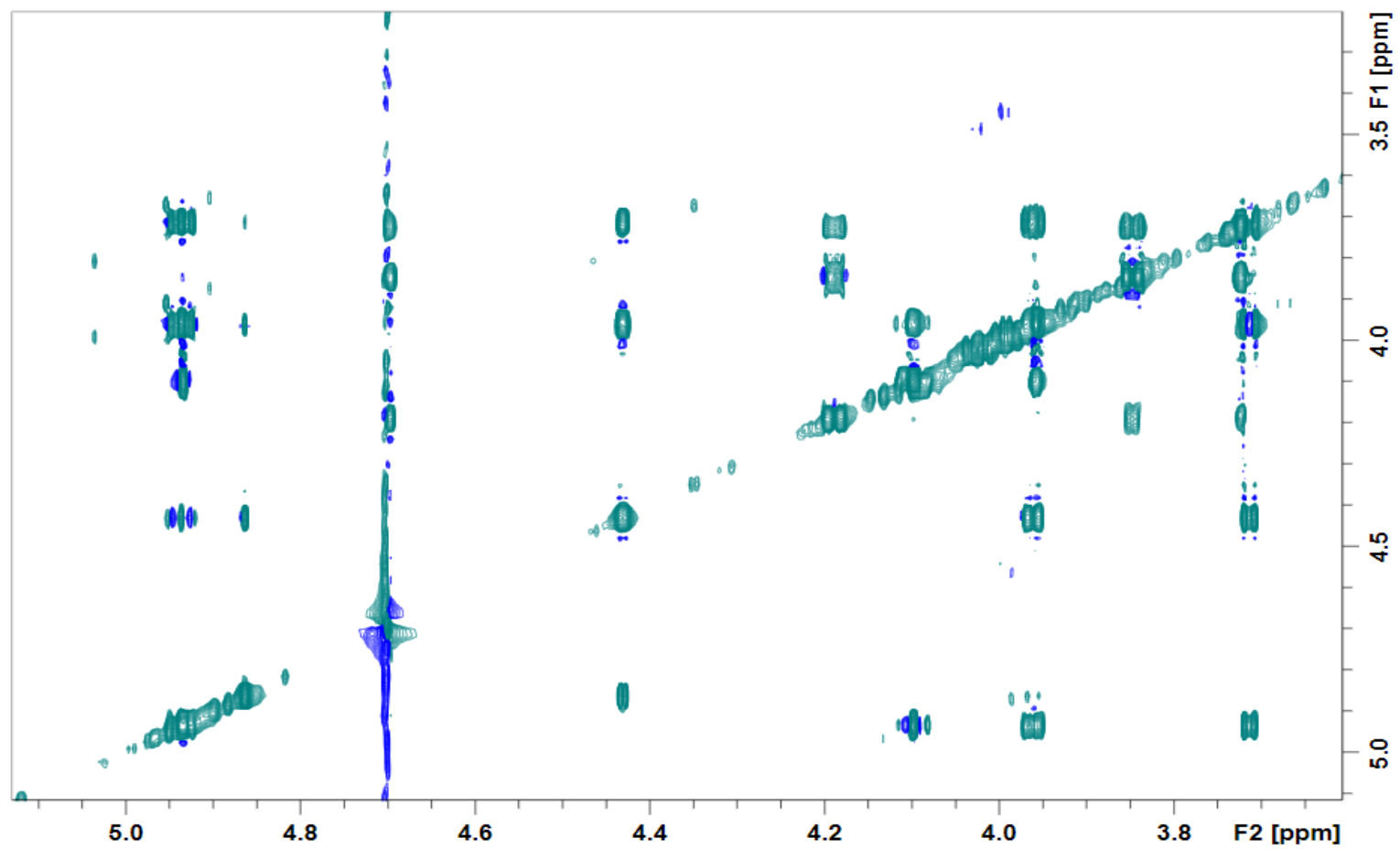
Anexo V: Espectro $^1\text{H-NMR}$ del trisacárido de CP8



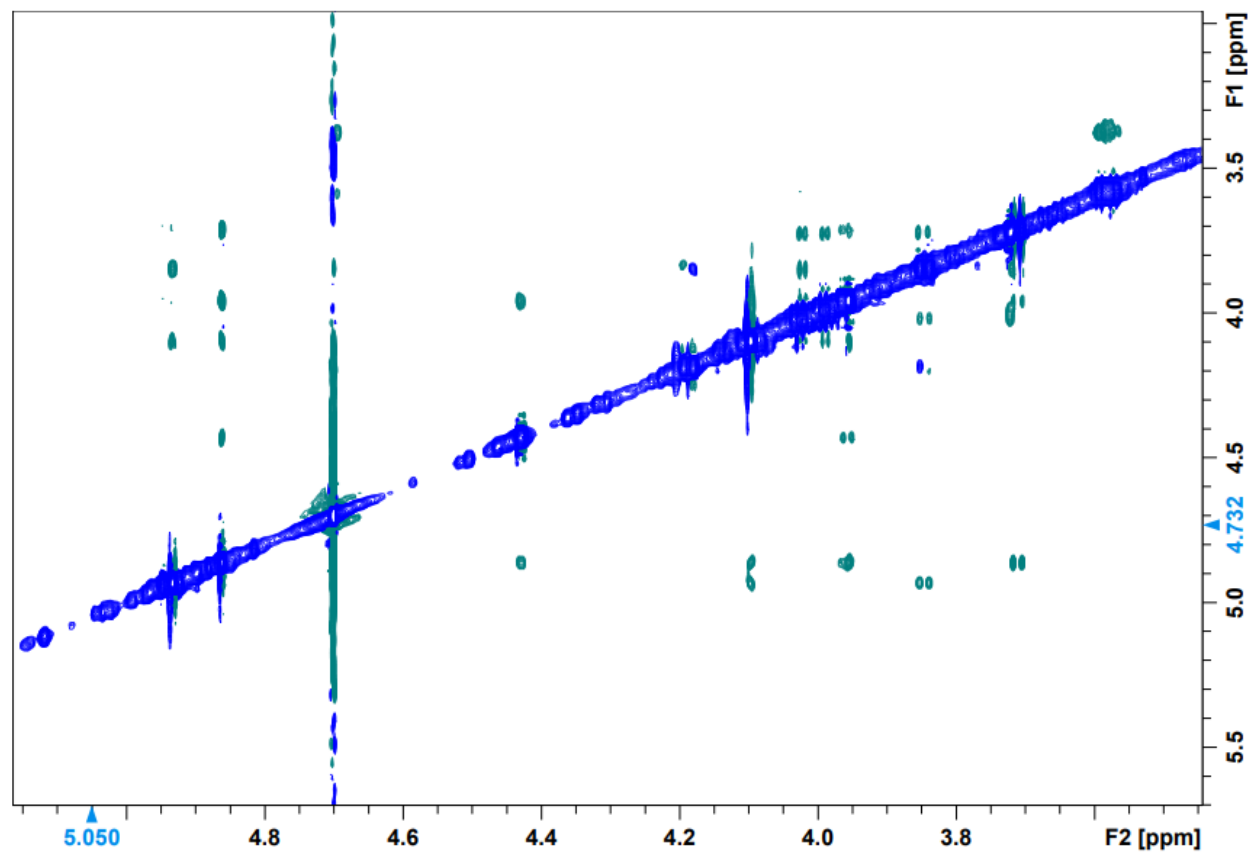
Anexo VI: Espectro ^1H - ^{13}C -HSQC editado del trisacárido de CP8



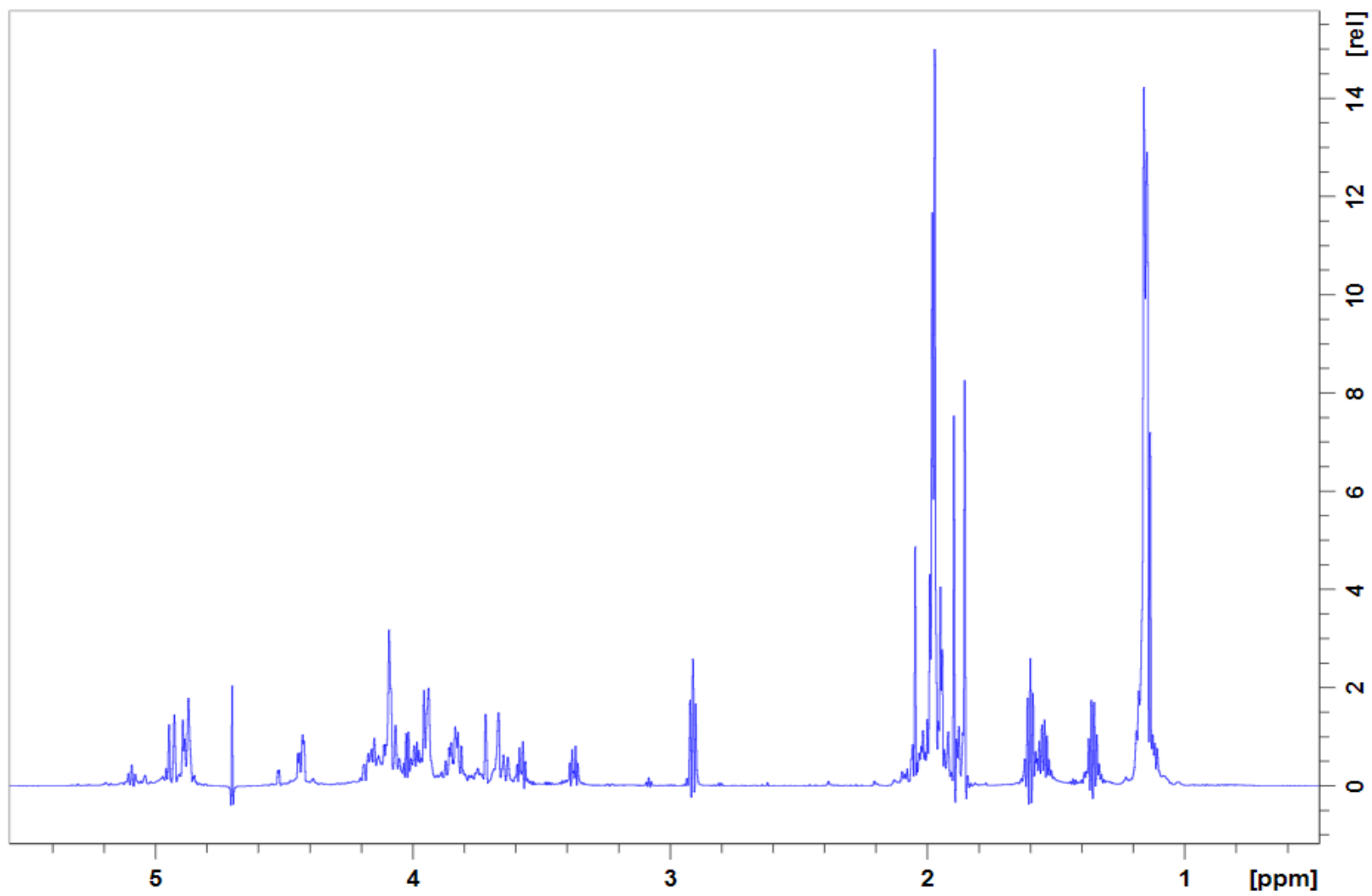
Anexo VII: Espectro TOCSY del trisacárido de CP8



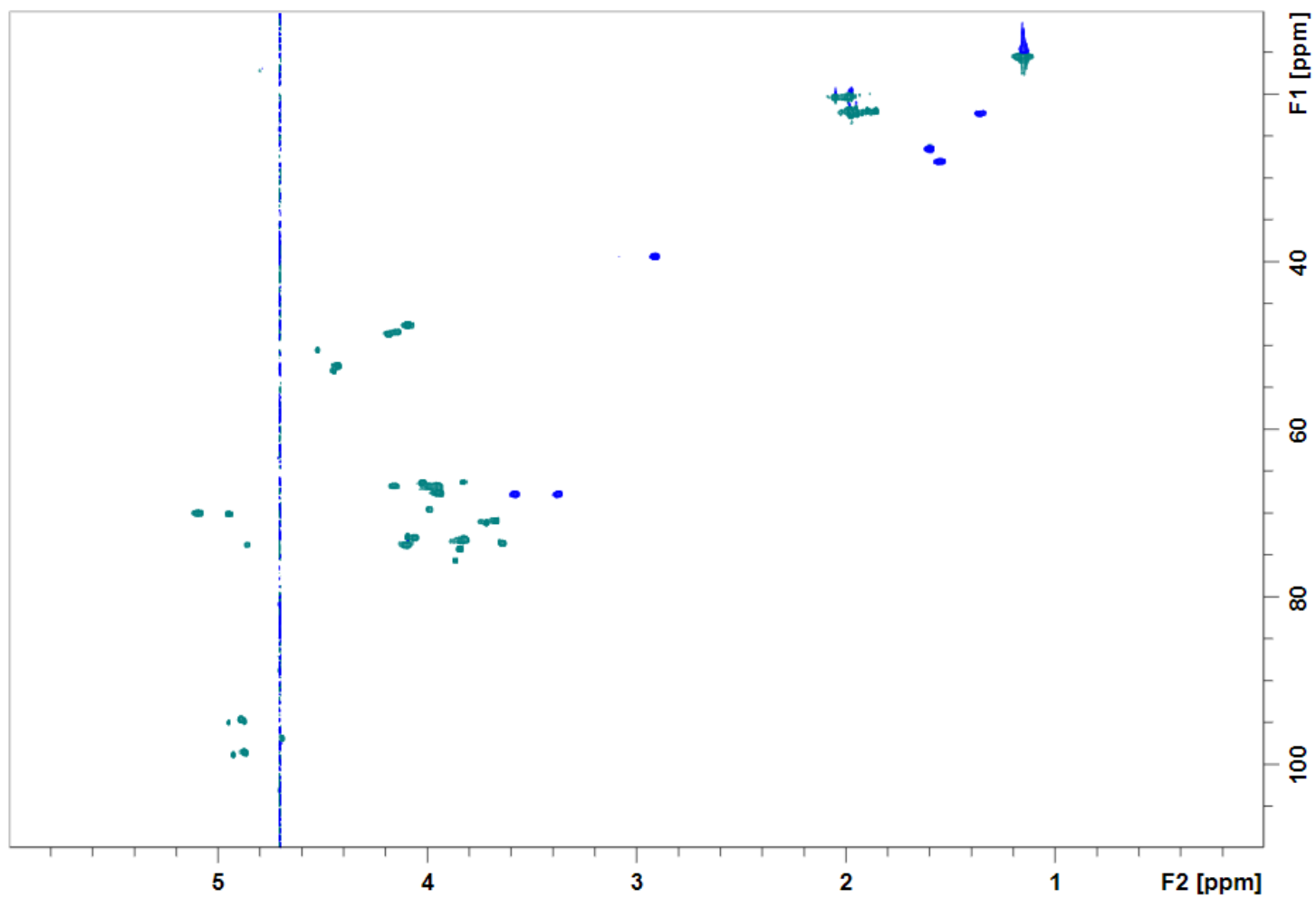
Anexo VIII: Espectro ROESY del trisacárido de CP8



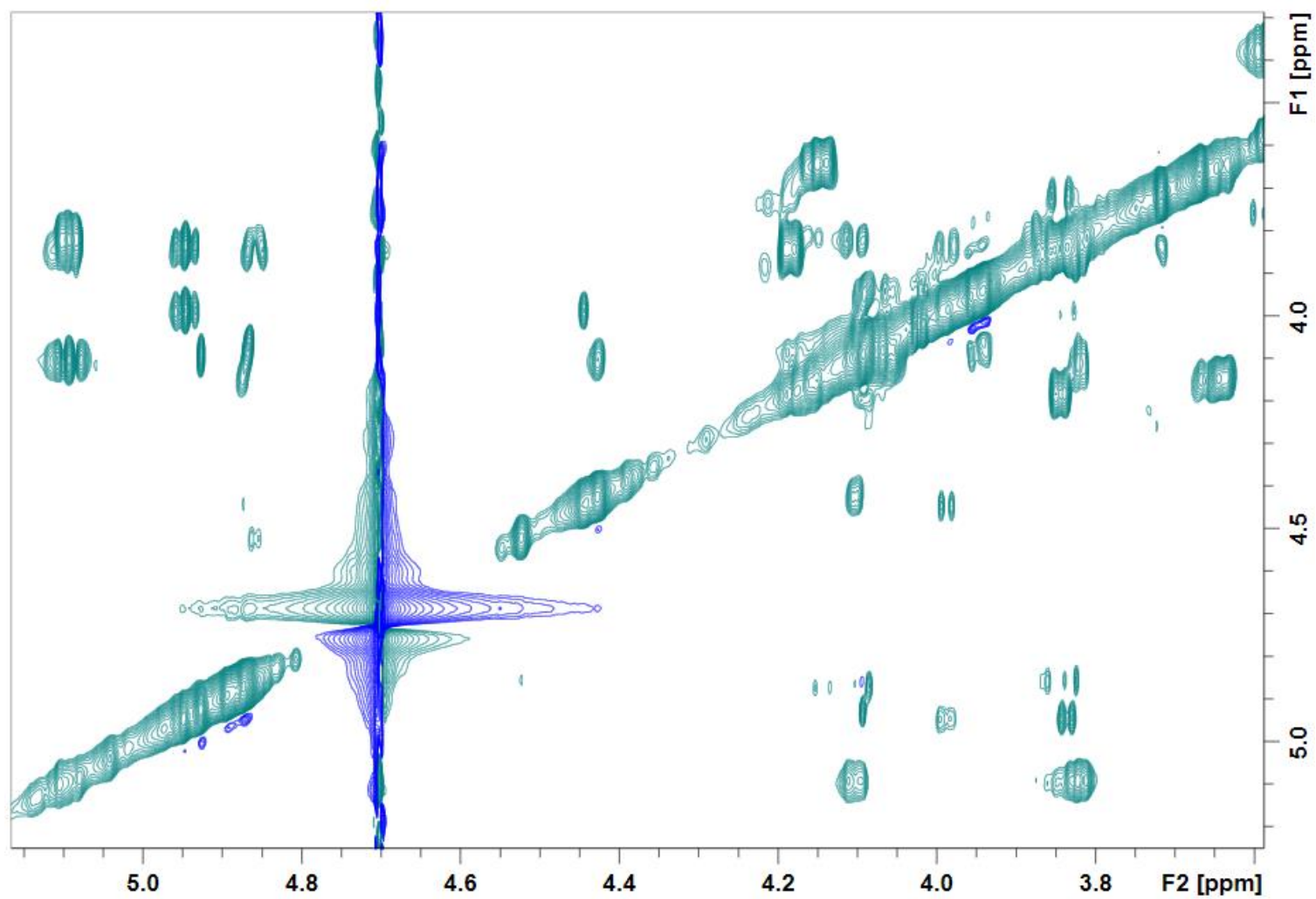
Anexo IX: Espectro ^1H -NMR del nonasacárido de CP8



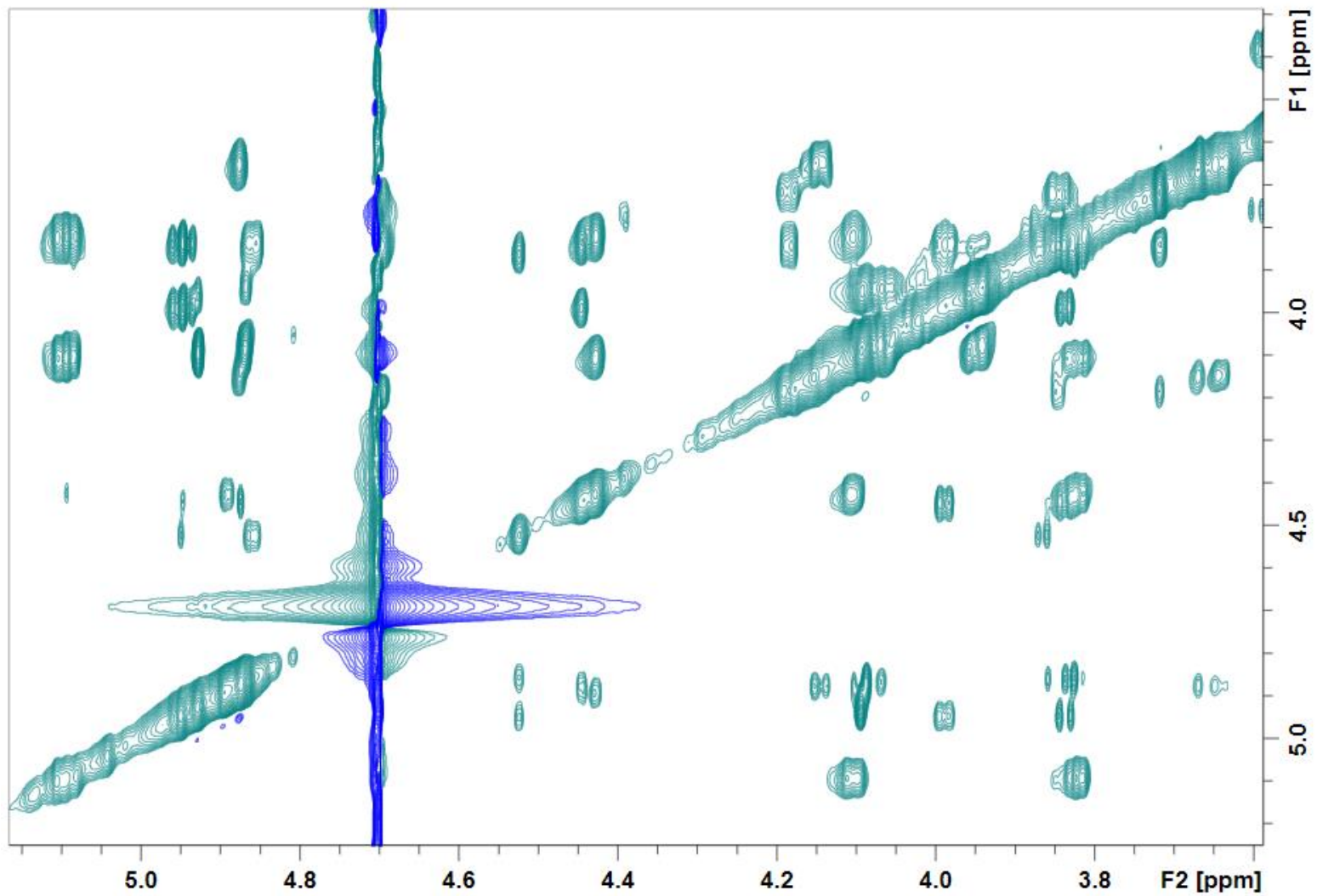
Anexo X: Espectro ^1H - ^{13}C -HSQC editado del nonasacárido de CP8



Anexo XI: Espectro TOCSY (mixing time) del nonasacárido de CP8



Anexo XII: Espectro TOCSY (mixing time) del nonasacárido de CP8



Anexo XI: Espectro NOESY del nonasacárido de CP8

