

## Nuevas aportaciones al estudio estructural de glicopéptidos

Alberto Avenzoa, Jesús Héctor Busto, Francisco Corzana,\* y Jesús Manuel Peregrina

**Resumen:** En los últimos años las glicoproteínas han sido objeto de cuantiosos estudios de tipo estructural debido al importante papel que juegan estas moléculas en distintos procesos biológicos. Actualmente, se desconocen cuáles son los factores que permiten al carbohidrato modificar las preferencias conformacionales de la parte peptídica y viceversa, lo cual es esencial para llegar a un mayor entendimiento de los procesos biológicos en los que estas moléculas intervienen. En este sentido, nuestro grupo lleva varios años realizando la síntesis y el análisis conformacional de pequeños péptidos y glicopéptidos en disolución acuosa. Dicho análisis se realiza combinando experimentos de Resonancia Magnética Nuclear, con cálculos computacionales de Dinámica Molecular y DFT.

**Palabras clave:** Glicopéptidos, análisis conformacional, mucinas, RMN, dinámica molecular.

**Abstract:** Glycoproteins have attracted much attention in recent years because they are involved in fundamental biological processes. At the present moment, the mechanisms that allow the carbohydrate to modify the conformational equilibrium of the peptide backbone and viceversa remain to be elucidated, which is essential to discern how glycoproteins interact with their biological targets. On this basis, our group is working in the synthesis and the conformational analysis in aqueous solution of different model peptides and glycopeptides. The conformational analysis combines Nuclear Magnetic Resonance data with Molecular Dynamics simulations and DFT calculations.

**Keywords:** Glycopeptides, conformational analysis, mucins, NMR, molecular dynamics.

### Introducción

Las bases de la biología molecular moderna se asientan sobre el modelo de transmisión de la información biológica desde el ADN hasta el ARN y de ahí hasta la proteína. A pesar de que durante años se ha creído que las proteínas son las responsables de dicha transmisión hasta la célula, en la actualidad se sabe que este mecanismo es mucho más complejo, jugando un papel fundamental los glicoconjugados (compuestos formados por uniones covalentes de distintos carbohidratos a lípidos o proteínas).

Dada la complejidad estructural de los carbohidratos, junto con el hecho de que su biosíntesis no pueda predecirse directamente del ADN, como es el caso de las proteínas, su estudio en diferentes procesos biológicos ha sufrido un retraso con respecto a otras biomoléculas, como los lípidos y las proteínas. Sin embargo, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, en los últimos años, se ha abierto una nueva área de investigación en el campo de la biología molecular denominada *glicobiología*.<sup>[1-7]</sup> En su sentido más amplio, la glicobiología abarca el estudio de la estructura, biosíntesis y biología de carbohidratos que están extensamente distribuidos en la Naturaleza, siendo uno de los campos que más rápidamente ha crecido en las ciencias biomédicas, con relevancia en la biomedicina y la biotecnología.

Las glicoproteínas se caracterizan por llevar uno o más oligosacáridos covalentemente unidos mediante enlaces glicosídicos de tipo  $\alpha$  ó  $\beta$  a la cadena peptídica. En función de la naturaleza de estos enlaces, las glicoproteínas se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- *N*-glicoproteínas: habitualmente el oligosacárido está unido mediante un enlace *N*-glicosídico a un residuo de asparagina (Asn) de una cadena peptídica.
- *O*-glicoproteínas: normalmente el carbohidrato está enlazado mediante un enlace *O*-glicosídico al grupo hidroxilo de la serina (Ser) o de la treonina (Thr) de una cadena peptídica.

Presumiblemente, la glicosilación de proteínas es uno de los procesos post-traduccionales de mayor complejidad y, a su vez, puede ser la clave para entender las funciones biológicas que desempeñan. Por otro lado, la importancia de estudiar las glicoproteínas queda patente en el hecho de que se estima que más del 50% de las proteínas de las células eucariotas están glicosiladas.

Uno de los tipos de *O*-glicoproteínas más importantes lo constituyen las mucinas, las cuáles se encuentran en la membrana de muchas células epiteliales y se caracterizan por poseer varias serinas y treoninas consecutivas glicosiladas. Este alto grado de glicosilación parece ser el responsable de algunas de sus propiedades más importantes, como el aumento de estabilidad, reduciendo su vulnerabilidad a la degradación proteolítica. Además, las mucinas están involucradas en la protección celular frente a patógenos (bacterias y virus), proporcionando lubricación en una variedad de tejidos debido a su capacidad de hidratación. Participan en los procesos de inflamación interactuando con las selectinas y en los procesos de respuesta inmunológica. De hecho, algunas mucinas se emplean como marcadores en el diagnóstico de ciertos cánceres. En las mucinas, el primer residuo de carbohidrato unido a la cadena peptídica es la *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), y siempre se une a través de un enlace  $\alpha$ -*O*-glicosídico a serina o treonina. Este glicoaminoácido es conocido como antígeno T<sub>N</sub> (Figura 1a).

Actualmente, se sabe que en las células tumorales las mucinas están sobreexpresadas, incluyendo cambios en la glicosilación. Como consecuencia del mal funcionamiento de algunas glicosiltransferasas, las células cancerosas presentan glicoproteínas parcialmente glicosiladas y con glicanos más cortos y menos complejos de lo normal. Esto determina que algunos tipos de carbohidrato, que en las células normales se



J. H. Busto    J. M. Peregrina    A. Avenzoa    F. Corzana\*

Departamento de Química, Universidad de La Rioja, UA-CSIC, Logroño – La Rioja

C-e: francisco.corzana@unirioja.es

Recibido: 02/07/2007. Aceptado: 31/08/2007.

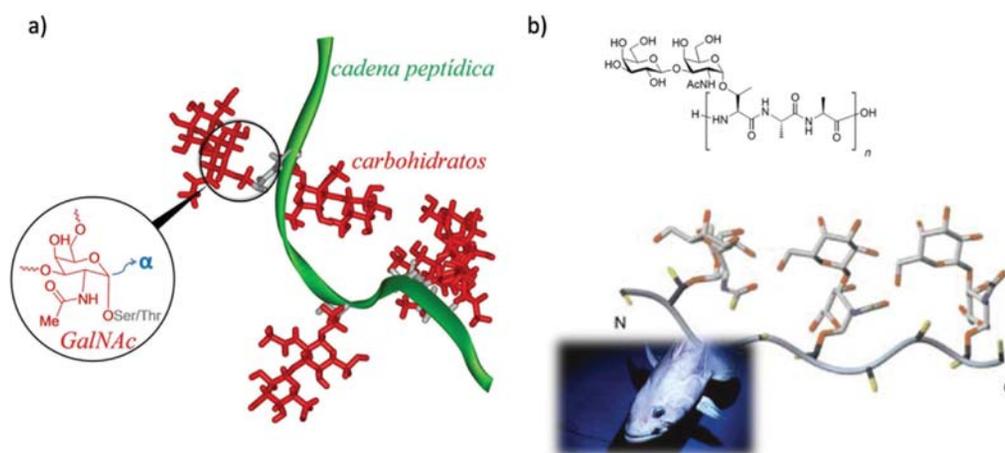


Figura 1. a) Estructura de las mucinas. b) Estructura general de las proteínas anticongelantes.

encuentran enmascarados por la presencia de otros más externos, queden expuestos en la superficie celular, resultando la formación de nuevos antígenos asociados al cáncer. Este hecho convierte a las mucinas en prometedoras candidatas para la terapia contra el cáncer (vacunas basadas en carbohidratos).<sup>[8-13]</sup>

Otro tipo importante de *O*-glicoproteínas son las denominadas proteínas anticongelantes<sup>[14]</sup> (Figura 1b), las cuales permiten sobrevivir a temperaturas muy bajas a animales que habitan en aguas polares, ya que dichas proteínas inhiben el crecimiento de cristales de hielo en su interior, evitando así la congelación de los fluidos de estos organismos vivos. Actualmente se conoce muy poco sobre el mecanismo de su actividad anticongelante, aunque se sabe que está relacionado con la existencia de tres elementos claves: el grupo acetamido en la posición 2 del carbohidrato, la configuración  $\alpha$  del enlace *O*-glicosídico y la presencia del grupo metilo en posición  $\beta$  de la treonina.<sup>[15]</sup>

Hasta la década de los 80, se creía que sólo existían glicoproteínas en la membrana celular, en la superficie de los orgánulos intracelulares o como moléculas secretadas. Sin embargo, en la actualidad se conoce que ciertos tipos de glicoproteínas se sintetizan y residen dentro del citoplasma y el núcleo, como las glicoproteínas  $\beta$ -*O*-glicosiladas con la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). En este sentido, hay varios estudios que indican que la glicosilación con GlcNAc juega un papel relevante en la diabetes y en la degeneración neuronal.<sup>[16]</sup> El hecho de que esta forma de glicosilación se descubriera tan tarde ha acentuado el estado relativamente inexplorado de *O*-glicoproteínas con enlace glicosídico  $\beta$ .

Existen otros tipos de *O*-glicosilación menos frecuente,<sup>[17]</sup> como por ejemplo con  $\alpha$ -manosa ( $\alpha$ Man),  $\alpha$ -fucosa ( $\alpha$ Fuc) o con  $\beta$ -glucosa ( $\beta$ Glc). Así, se han encontrado glicoproteínas relacionadas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF)<sup>[18]</sup> y con el receptor Notch<sup>[19]</sup> donde la  $\beta$ Glc está unida a un residuo de serina. Desgraciadamente, el papel de la glucosa en estos sistemas es desconocido y no exento de debate.

Lógicamente, la glicosilación no sólo afecta a la estabilidad de la proteína, sino que, además, los distintos carbohidratos unidos a ella pueden inducir importantes cambios conformacionales. Así, se sabe que en las mucinas la  $\alpha$ -*O*-glicosilación con GalNAc fuerza a la cadena peptídica a adquirir conformaciones extendidas, como la lámina  $\beta$ , poliprolina II

(PPII),... Estas variaciones en la estructura del compuesto se deben a interacciones entre los restos carbohidrato y peptídico de la molécula. Algunos estudios sugieren la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el protón de la amida del GalNAc y el oxígeno carbonílico del mismo aminoácido al que está unido<sup>[20]</sup> (Figura 2). Los estudios concluyen también que estos enlaces de hidrógeno son más débiles de lo normal, con una distancia promedio NH-O en torno a 2.7 Å. Además, alguno de estos estudios indican que los derivados  $\beta$  con GalNAc no inducen ningún cambio conformacional en el péptido, debido a la no existencia de estos enlaces de hidrógeno.

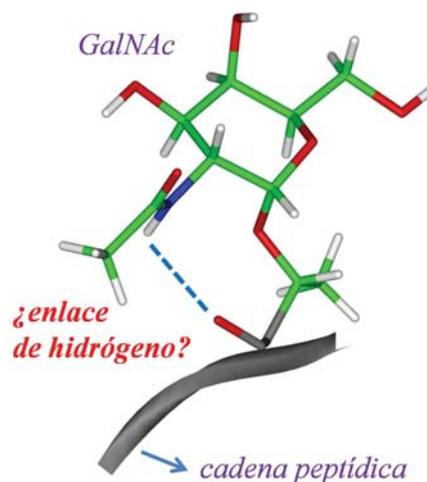


Figura 2. Interacción, a través de un hipotético enlace de hidrógeno, entre el GalNAc y el aminoácido al que se encuentra unido.

Por otro lado, otros autores achacan estos cambios en la estructura del péptido a impedimentos estéricos, ya que la glicosilación se da, generalmente, en varios puntos contiguos de la cadena peptídica.<sup>[21]</sup>

Obviamente, y teniendo en cuenta estos antecedentes, con objeto de llegar a un mayor entendimiento de los procesos biológicos en los que intervienen las glicoproteínas es esencial profundizar en el conocimiento de los mecanismos que permiten a la parte carbohidrato modificar los equilibrios conformacionales de la cadena peptídica a la que está unida. Es decir, es fundamental dar respuesta a preguntas tales como:

## Nuevas aportaciones al estudio estructural de glicopéptidos

- ¿cómo influyen la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -O-glicosilación en la conformación del péptido o de la proteína?
- ¿son realmente los enlaces de hidrógeno entre el carbohidrato y la cadena peptídica los que modifican la conformación de ésta?
- ¿por qué es esencial la presencia de treonina en las proteínas anticongelantes?

Con el fin de esclarecer alguna de estas preguntas nuestro grupo de investigación lleva varios años sintetizando y realizando el análisis conformacional de distintos péptidos y glicopéptidos modelo,<sup>[22–25]</sup> como los que se muestran en la Figura 3. Estas moléculas son los glicopéptidos modelo más sencillos que se pueden sintetizar. En ellas, los aminoácidos están funcionalizados en forma de diamida para emular una cadena peptídica.

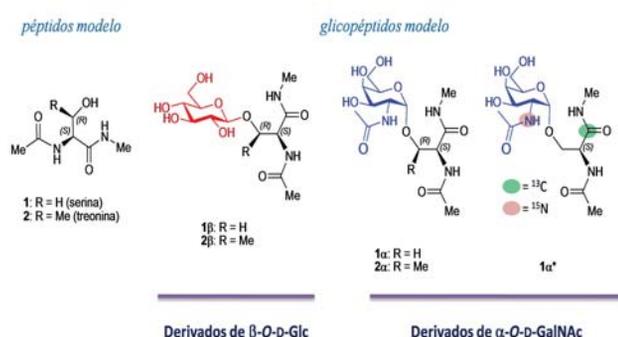


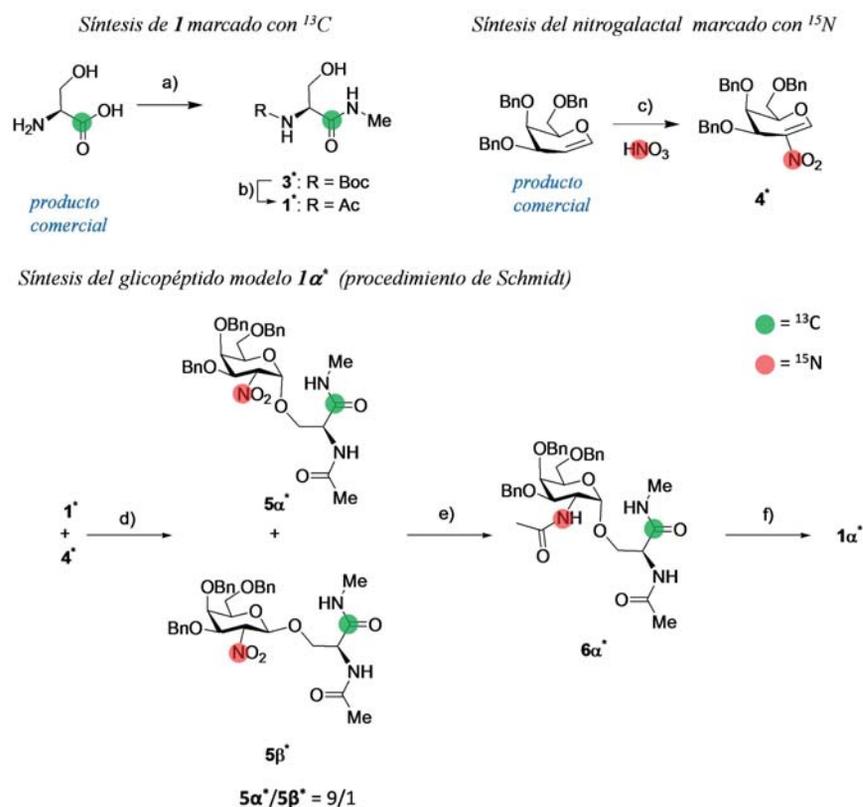
Figura 3. Distintos péptidos y glicopéptidos modelo estudiados en disolución acuosa.

## Síntesis de los péptidos y glicopéptidos modelo

Los péptidos modelo **1** y **2** se sintetizaron a partir de los aminoácidos naturales serina y treonina, respectivamente. A su vez, la formación del enlace  $\beta$ -O-glicosídico en los glicopéptidos modelo **1 $\beta$**  y **2 $\beta$**  se llevó a cabo por reacción de Koenigs-Knorr<sup>[26]</sup> entre los péptidos **1** ó **2** y el bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo. Finalmente, para la formación del enlace  $\alpha$ -O-glicosídico en los glicopéptidos **1 $\alpha$** , **1 $\alpha$ \*** y **2 $\alpha$**  se empleó una adición de tipo Michael de los péptidos modelo **1**, **1\*** y **2** al nitrogalactal, siguiendo el procedimiento descrito por Schmidt y colaboradores.<sup>[27,28]</sup> En el Esquema 1 se muestra, a modo de ejemplo, la síntesis del compuesto marcado **1 $\alpha$ \***.

En el análisis conformacional de estas moléculas son fundamentales los siguientes parámetros (Figura 4):

- Los ángulos diedros  $\phi_p$  y  $\psi_p$ , que determinan la geometría de la cadena peptídica. Aunque existe un gran número de combinaciones para los valores que pueden tomar estos ángulos, sin embargo, sólo algunas de ellas van a dar lugar a conformaciones energéticamente favorables y suelen aparecer representadas en diagramas de tipo Ramachandran. Dentro de éstas, destacan la hélice  $\alpha$  y la lámina  $\beta$ , estructuras secundarias particularmente estables que forman parte de un gran número de proteínas.
- El ángulo diedro  $\chi^1$ , que da una idea de la disposición de la cadena lateral.
- Los ángulos diedros  $\phi_s$  y  $\psi_s$ , que están relacionados con la geometría del enlace glicosídico. En general  $\phi_s$  es bas-



Esquema 1. Síntesis del glicopéptido modelo **1 $\alpha$ \***. Condiciones de reacción y rendimientos: (a) i.  $\text{Boc}_2\text{O}$ , NaOH 1N, dioxano, 25 °C, 24 h, ii.  $\text{MeNH}_2\text{-HCl}$ , TBTU, DIEA,  $\text{MeCN}$ , 25 °C, 10 h, 64%; (b) i. TFA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 3,5 h, ii.  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Py, 25 °C, 3 h, 73%; (c)  $\text{H}^{15}\text{NO}_3$  conc.,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , -50 °C, 0,5 h, iii.  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 0,5 h, 81%; (d)  $t\text{BuOK}$ , THF, 25 °C, 12 h, 60%; (e) i. Ni-Raney T4 (Pt),  $\text{H}_2$ , EtOH, 1 atm, 25 °C, 3 h, ii.  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Py, 25 °C, 3 h, iii. Separación por columna cromatográfica, 83%; (f)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH-EtOAc, 1 atm, 25 °C, 12 h, ~100%.

tante rígido y su valor viene determinado por el llamado efecto exo-anomérico.<sup>[29]</sup> Así, en los enlaces  $\alpha$ -*O*-glucosídicos  $\phi_s$  toma un valor próximo a  $+60^\circ$ , mientras que para enlaces  $\beta$ -*O*-glucosídicos el valor está en torno a  $-60^\circ$ .

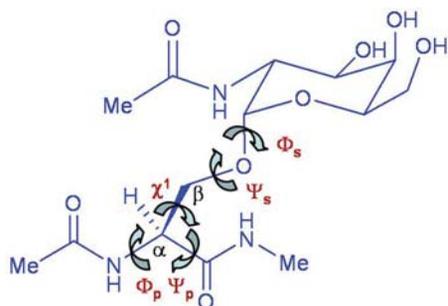


Figura 4. Principales ángulos diedros del derivado  $\alpha$ -*O*-D-GalNAc-Ac-L-Ser-NHMe (**1 $\alpha$** ).

El análisis conformacional de estas moléculas se lleva a cabo combinando la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con cálculos de Dinámica Molecular (DM).<sup>[30]</sup> Es importante señalar que el análisis de moléculas pequeñas basado en el efecto NOE<sup>[31]</sup> y en constantes de acoplamiento escalar ( $J$ )<sup>[32]</sup> es frecuentemente insuficiente para determinar las preferencias conformacionales de estas moléculas. En particular, en aquellos casos donde la molécula explora diferentes regiones del espacio conformacional, los datos de RMN representan un promedio de todas las conformaciones presentes en disolución. De esta forma, no existe un procedimiento sencillo para determinar sus geometrías y sus poblaciones relativas. De hecho, la interpretación directa de NOEs en moléculas flexibles puede conducir a la determinación de conformaciones virtuales de alta energía.<sup>[33]</sup> Por otro lado, mientras que los cálculos de DM identifican bastante bien las conformaciones de baja energía para una molécula dada, éstos generalmente fallan a la hora de predecir sus poblaciones relativas.<sup>[34]</sup> En nuestro caso, combinamos datos de RMN con DM con restricciones promediadas en el tiempo, con el objetivo de obtener una distribución de conformeros de baja energía

capaces de reproducir de forma cuantitativa los datos de RMN.<sup>[35,36]</sup> Así, este procedimiento elimina las limitaciones inherentes a ambas técnicas y proporciona un camino para estudiar la flexibilidad de pequeñas moléculas mediante la interpretación de los datos de RMN. Además, si los cálculos de DM son llevados a cabo en agua, simulando así las condiciones fisiológicas, este procedimiento permite estudiar a nivel molecular cómo influye el agua en las conformaciones de estos glicopéptidos modelo y viceversa, es decir, cómo estructura el glicopéptido las moléculas de agua presentes en su primera esfera de solvatación. Por otro lado, y gracias a cálculos DFT,<sup>[37,38]</sup> podemos conocer el origen físico de las preferencias conformacionales de nuestros derivados.

### Influencia de la $\beta$ -*O*-D-glicosilación en la cadena peptídica

Inicialmente, y teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, para evaluar las implicaciones que la  $\beta$ -*O*-glicosilación tiene sobre la estructura de un determinado péptido, se llevó a cabo la síntesis y el correspondiente análisis estructural de los péptidos modelo **1** y **2** derivados de L-Ser y L-Thr, respectivamente como péptidos referencia, así como de sus correspondientes glicopéptidos más simples **1 $\beta$**  y **2 $\beta$**  (Figura 3).<sup>[23]</sup> Es importante hacer notar que hasta la fecha se han publicado muy pocos estudios conformacionales acerca de glicopéptidos pequeños y que la investigación de glicopéptidos que contiene Glc se limita a muy pocos ejemplos y en tan sólo dos casos los estudios se llevaron a cabo en agua como disolvente.<sup>[39,40]</sup>

Siguiendo el protocolo anteriormente comentado, es decir utilizando como restricciones los datos de distancia protón-protón y de constantes de acoplamiento obtenidos por RMN en los cálculos de DM, se dedujo el porcentaje de las distintas conformaciones existentes en disolución acuosa para estas moléculas. En la Figura 5 se muestran las distribuciones obtenidas para la *cadena peptídica* del compuesto **1**, así como de su derivado glicosilado **1 $\beta$** . Como puede observarse, mientras que el péptido adopta de forma mayoritaria conformaciones extendidas, en el glicopéptido modelo el espacio con-

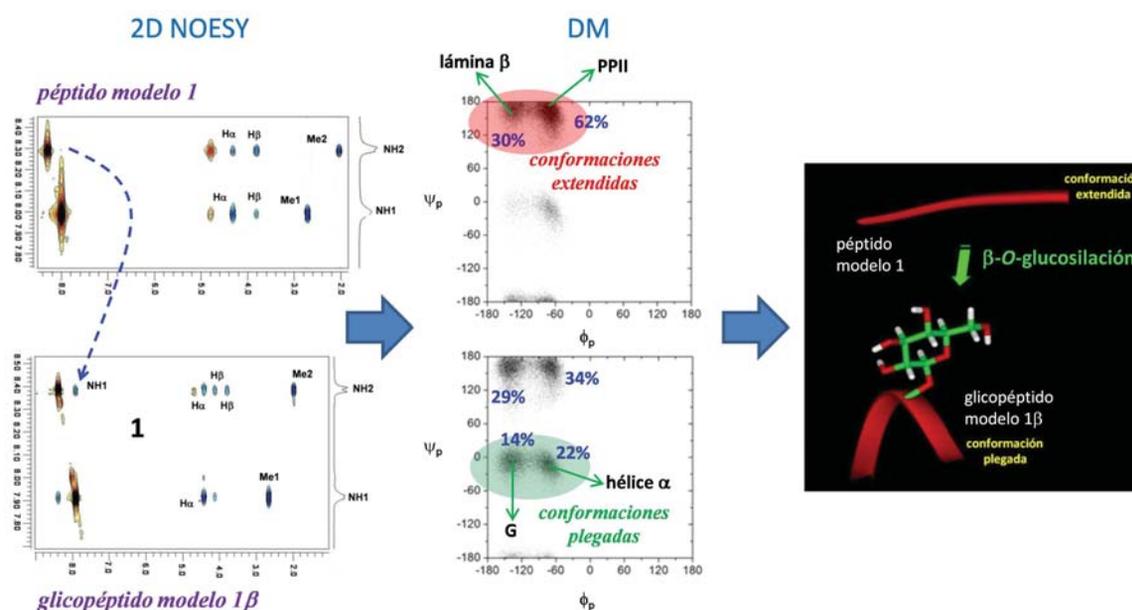


Figura 5. Influencia de la  $\beta$ -*O*-D-glicosilación en las conformaciones de la *cadena peptídica*.

## Nuevas aportaciones al estudio estructural de glicopéptidos

formacional accesible es mayor, apareciendo poblaciones significativas de conformaciones plegadas. Un resultado muy similar se obtuvo para los derivados de treonina **2** y **2β**. Por tanto, se puede decir que la β-D-O-glucosidación de los péptidos modelo derivados de los aminoácidos serina y treonina afecta significativamente a su estructura, siendo responsable del cambio parcial de conformaciones extendidas, observadas en los péptidos modelo, a conformaciones plegadas, presentes en los glicopéptidos.<sup>[23]</sup>

Los resultados obtenidos mediante cálculos de DM y DFT apuntan hacia la existencia de moléculas de agua que enlazan las partes peptídica y carbohidrato del glicopéptido. Dichas moléculas de agua podrían explicar la estabilización de las conformaciones plegadas observadas en disolución acuosa, tal como se muestra en la Figura 6.

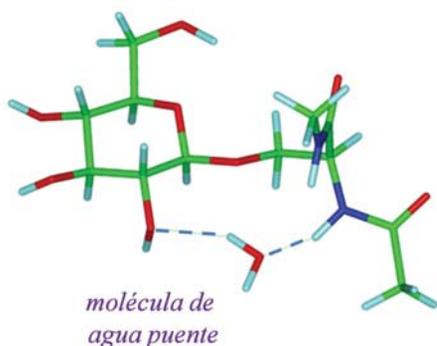


Figura 6. Estabilización de conformaciones plegadas en **1β** mediante moléculas de agua puente.

### Influencia de la α-O-D-glicosilación en la cadena peptídica

El estudio conformacional llevado a cabo sobre los glicopéptidos modelo derivados de α-O-GalNAc, compuestos **1α** y **2α** de la Figura 3, indica claramente que éstos presentan conformaciones extendidas<sup>[23]</sup> similares a las previamente encontradas para los péptidos modelo **1** y **2**. Además, puede decirse que su comportamiento en disolución acuosa es esencialmente igual al previamente descrito para otros glicopéptidos de mayor tamaño y derivados de glicoproteínas naturales.

Como se ha comentado anteriormente, algunos trabajos sugieren que la estructura extendida de la *cadena peptídica* estaría estabilizada por la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el protón NH de la amida del GalNAc y el oxígeno carbonílico del aminoácido al que está unido el carbohidrato,<sup>[20]</sup> tal como se muestra en la Figura 2.

Para determinar la fortaleza de este enlace se llevaron a cabo distintos experimentos de RMN sobre el compuesto **1α\*** marcado con <sup>15</sup>N y <sup>13</sup>C en las posiciones que aparecen en la Figura 7. Sin embargo, en ninguna de las condiciones experimentales probadas se pudieron medir las constantes de acoplamiento  $J_{15N,13C}$  y  $J_{H,13C}$ ,<sup>[41,42]</sup> lo que sugiere que este enlace de hidrógeno, caso de existir, debe ser débil.

Con el fin de conocer qué otros factores pueden contribuir a estabilizar las conformaciones extendidas en glicopéptidos derivados de mucinas, se decidió llevar a cabo un estudio detallado de la hidratación en los derivados **1α** y **2α**. En el caso del compuesto **1α**, la interpretación de los datos obtenidos por RMN con cálculos de DM sugieren la presencia de moléculas de agua puente entre el NH del grupo

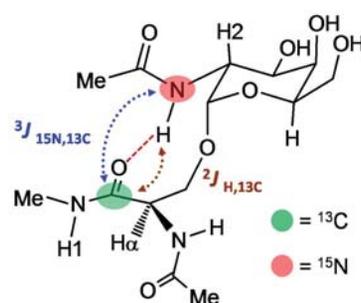


Figura 7. Constantes de acoplamiento medidas en el glicopéptido **1β\*** para determinar la fortaleza del enlace de hidrógeno entre el grupo NHAc del GalNAc y el grupo C=O del aminoácido.

acetamido del GalNAc y el carbono carbonílico de la serina (Figura 8). En esta figura se muestra además la estructura de menor energía obtenida por cálculos DFT de la conformación mayoritaria para el compuesto **1α** incluyendo su primera esfera de hidratación. Es importante señalar que la molécula de agua puente no es siempre la misma y que el tiempo de residencia máximo calculado para dichas moléculas es de unos 5 picosegundos. Por otro lado, los cálculos DFT sugieren que no sólo la molécula de agua puente es importante para mantener la estructura extendida en la *cadena peptídica*, sino también el resto de las moléculas de agua presentes en la primera esfera de solvatación. Por lo tanto, el agua juega un papel fundamental en el comportamiento conformacional de este tipo de moléculas.

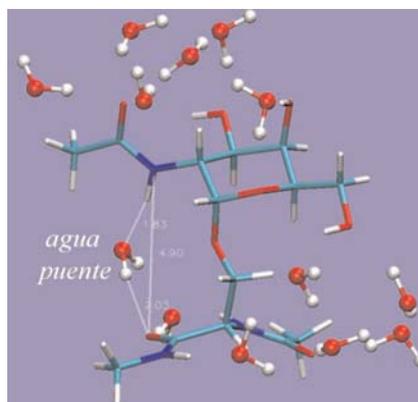


Figura 8. Geometría B3LYP/6-31G\* obtenida para la conformación mayoritaria del compuesto **1α** y su primera esfera de solvatación.

Uno de los datos más relevantes con respecto al análisis conformacional de los glicopéptidos **1α** y **2α** concierne a la geometría del enlace glicosídico. En este sentido, si bien estudios anteriores sugieren que el derivado de treonina rigidifica más la cadena lateral (ángulo diedro  $\chi^1$  en la Figura 4) que su homólogo de serina,<sup>[43-45]</sup> nada se ha dicho sobre la distinta disposición que la parte carbohidrato presenta en ambos derivados. Como puede observarse en la Figura 9, mientras que en **1α** el GalNAc y la *cadena peptídica* están dispuestos de forma paralela, en el derivado de treonina, y como consecuencia del distinto valor que toma el ángulo  $\psi_s$ , ambas partes están situadas perpendicularmente, lo que permite al grupo acetamido del GalNAc aproximarse más a la *cadena peptídica*. Esta diferente orientación del carbohidrato puede tener importantes efectos como se muestra a continuación.

Por un lado, y dada la mayor proximidad de ambos resi-

duos, el enlace de hidrógeno anteriormente aludido entre el NH del GalNAc y el carbonilo del aminoácido está menos desfavorecido en el derivado **2 $\alpha$** . Sin embargo, y a juzgar por los cálculos de DM, este enlace sigue siendo débil y, por tanto, debe tener poca relevancia en la estabilización de la conformación extendida en la *cadena peptídica*. Por otro, la primera esfera de solvatación de **2 $\alpha$**  difiere significativamente de la encontrada en el glicopéptido **1 $\alpha$** . Así, en el derivado de treonina, existen moléculas de agua puente entre el NH del GalNAc y el NH del grupo acetamido del aminoácido, tal como se muestra en la Figura 10. Además, en este caso, el tiempo de residencia máximo para una molécula de agua puente es de 10 picosegundos, es decir, aproximada-

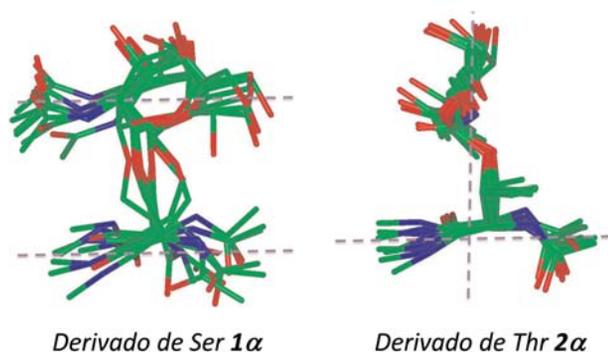


Figura 9. Superposición de los distintos conforméres de **1 $\alpha$**  y **2 $\alpha$**  obtenidos a partir de los cálculos de DM en agua.

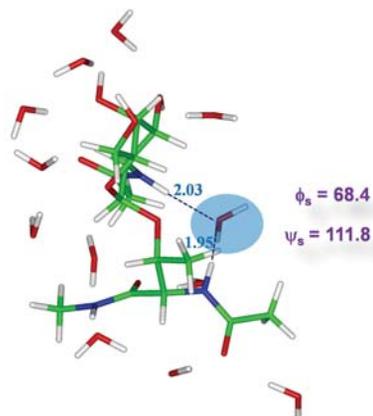


Figura 10. Geometría B3LYP/6-31G\* obtenida para la conformación mayoritaria del compuesto **2 $\alpha$**  y su primera esfera de solvatación.

mente el doble que para las moléculas de agua puente encontradas en el derivado de serina.

Este distinto comportamiento de los glicopéptidos modelo se ha observado también en otros glicopéptidos de mayor tamaño y estudiados previamente por otros grupos.<sup>[15,20]</sup> Además, este efecto parece ser independiente del centro anomérico –ya que se ha observado también en los glicopéptidos modelo con  $\beta$ GalNAc– y del carbohidrato unido a la *cadena peptídica*, pues se ha observado también en los derivados de  $\beta$ Glc, compuestos **1 $\beta$**  y **2 $\beta$** .<sup>[23]</sup>

El hecho de que los derivados **1 $\alpha$**  y **2 $\alpha$**  estructuren de distinta forma el agua a su alrededor puede tener importantes implicaciones biológicas. Por ejemplo, aunque todavía no se conoce a nivel molecular el mecanismo de actuación de las glicoproteínas anticongelantes, la hipótesis actual sugiere que su actividad podría estar relacionada con la formación de enlaces de hidrógeno irreversibles entre el agua y estas moléculas.<sup>[14]</sup> Presumiblemente, y atendiendo al hecho de que las moléculas de agua puente encontradas en el derivado de treonina tienen un tiempo de residencia mayor que las encontradas en el derivado de serina, la red de enlaces de hidrógeno podría ser más eficiente en **2 $\alpha$** , lo que podría explicar hasta cierto punto por qué es necesaria la presencia de treonina en las proteínas anticongelantes. A modo de ejemplo, es bien conocido que en el pequeño glicopéptido con actividad anticongelante  $\alpha$ -O-D-GalNAc-Thr-Ala-Ala, el cambio de Thr por Ser conlleva una pérdida de dicha actividad.<sup>[15]</sup>

Por otro lado, el derivado de treonina **2 $\alpha$**  presenta mayoritariamente una conformación eclipsada en torno al enlace C $\beta$ -O1s en disolución acuosa, tal como se refleja en la Figura 11. Teniendo en cuenta que esta conformación no es frecuente encontrarla en situaciones de baja energía, y con el fin de conocer el origen del distinto comportamiento conformacional de los derivados **1 $\alpha$**  y **2 $\alpha$** , se llevó a cabo un exhaustivo estudio teórico usando cálculos DFT y el esquema de partición NBO (*Natural Bond Orbital*).<sup>[46]</sup> Mediante este procedimiento puede calcularse tanto las interacciones repulsivas como las atractivas (hiperconjugación). Este estudio reveló que el origen de la distinta orientación del carbohidrato se debe fundamentalmente a una repulsión estérica entre el carbohidrato, y más concretamente entre los pares de electrones del oxígeno endocíclico, y el grupo metilo de la treonina. Esta repulsión es la responsable de que ambas partes (el carbohidrato y el metilo en  $\beta$ ) se dispongan lo más alejadas posible, dando lugar a la conformación eclipsada anteriormente comentada (Figura 11).

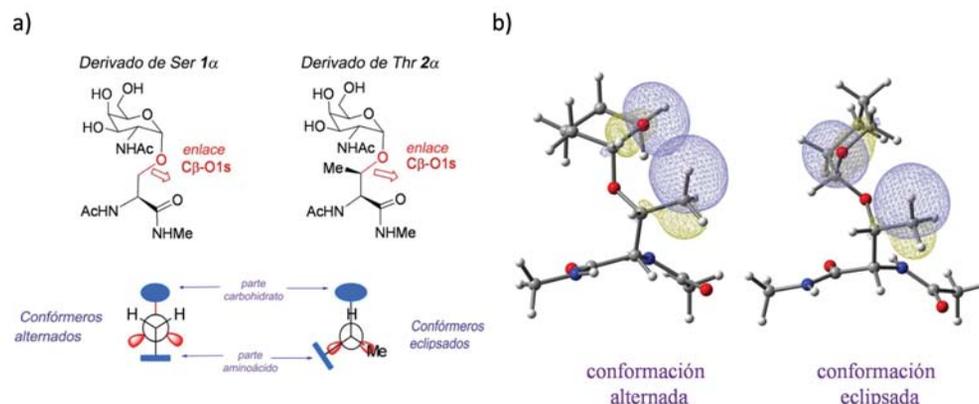


Figura 11. a) Proyecciones de Newman del enlace C $\beta$ -O1s en los derivados **1 $\alpha$**  y **2 $\alpha$** . b) Orbitales NBO de los enlaces  $\sigma_{C-H}$  (grupo metilo en  $\beta$  y  $n^1_O$  (oxígeno endocíclico) para un modelo simplificado del compuesto **2 $\alpha$** .

## Conclusiones y perspectivas

A continuación, intentando contestar a algunas de las cuestiones planteadas en la introducción, se establecen de forma breve las conclusiones más importantes derivadas de estos trabajos.

1. La  $\beta$ -O-glucosidación de derivados diamida de serina y treonina (compuestos **1 $\beta$**  y **2 $\beta$** ) promueve el cambio de conformaciones extendidas hacia plegadas en la cadena peptídica. Dichas conformaciones plegadas observadas en disolución acuosa están estabilizadas mediante moléculas de agua puente de la primera esfera de hidratación, que conectan el residuo carbohidrato con el peptídico.

2. Contrariamente a lo que se creía, estudios llevados a cabo en agua sobre los modelos más simples de mucina (compuestos **1 $\alpha$**  y **2 $\alpha$** ) revelaron que los enlaces de hidrógeno entre el protón de la amida de GalNAc y el oxígeno carboxílico de la serina o treonina, si existen, son muy débiles y por tanto no deben ser los responsables de las preferencias conformacionales de estos compuestos. Éstas pueden explicarse satisfactoriamente mediante la existencia de moléculas de agua puente entre las partes carbohidrato y peptídica. Además, cálculos DFT demostraron que no sólo estas moléculas de agua puente son las responsables de tales conformaciones, sino toda la primera esfera de hidratación. Por otro lado, es muy importante hacer notar las significativas diferencias observadas entre los derivados de serina y treonina, en lo que se refiere a dicha esfera de hidratación y sobre todo al agua puente que enlaza los residuos carbohidrato y peptídico. Esta diferencia sugiere que los derivados de serina y treonina estructuran el agua de su alrededor de forma distinta y quizás esta circunstancia sea clave en la presencia de treonina en las glicoproteínas anticongelantes.

3. En los glicopéptidos modelo sintetizados derivados de GalNAc se ha observado que el ángulo de torsión  $\psi$  del enlace glicosídico es muy diferente en derivados de serina y treonina, adoptando el carbohidrato una orientación radicalmente distinta para cada caso. Es importante destacar que en el derivado de treonina las conformaciones de mínima energía no son alternadas, sino que se corresponden con situaciones de eclipsamiento. El origen de este hecho reside fundamentalmente en las repulsiones estéricas existentes entre el metilo en posición  $\beta$  de la treonina y la parte carbohidrato (principalmente con los pares de electrones del oxígeno endocíclico). Además, este comportamiento es más general, ya que parece ser independiente del centro anomérico y del residuo de carbohidrato.

Para concluir, en la actualidad se está llevando a cabo la síntesis y el análisis conformacional de glicopéptidos derivados de serina y treonina de mayor tamaño para la cadena peptídica. Además, y dada la experiencia que el grupo de investigación posee en la síntesis de  $\beta$ -hidroxi-aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos,<sup>[47]</sup> se están sintetizando nuevos glicopéptidos derivados también de  $\alpha$ GalNAc y de  $\beta$ Glc con estos hidroxi-aminoácidos no naturales. En este sentido, los resultados preliminares son prometedores ya que se obtiene conformaciones no observadas anteriormente con los derivados de aminoácidos naturales.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de La Rioja (proyecto API-05/B01), al gobierno de La Rioja (proyectos ANGI-2004/03 y ANGI-2005/01) y al Ministerio de Educación y

Ciencia (proyecto CTQ2006-05825 y contratos del programa Ramón y Cajal de J.H.B. y F.C.) por el apoyo económico recibido. Asimismo agradecen al CESA (Santiago de Compostela) los equipos y los programas utilizados para la realización de los cálculos computacionales. Finalmente, los autores desean expresar su agradecimiento al resto de los miembros del grupo de investigación y en especial a las personas que han participado en los trabajos que se resumen en este artículo: G. Jiménez-Osés, M. García de Luis, A. Fernández-Tejada, S. B. Engelsen, J. L. Asensio y J. Jiménez-Barbero.

## Bibliografía

- [1] *Essentials of Glycobiology* (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. W. Hart, J. Marth), Cold Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor, New York, **1999**.
- [2] M. R. Pratt and C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, *34*, 58–68.
- [3] P. Van den Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151–208.
- [4] G. J. Strous, J. Dekker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1992**, *27*, 57–92.
- [5] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [6] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [7] *Glycopeptides and Glycoproteins: Synthesis, Structure, and Application Topics in Current Chemistry*, (Ed.: V. Wittmann), Springer-Verlag, Berlin, vol. 267, **2007**.
- [8] C. Brocke, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 3085–3112.
- [9] S. Dziadek, H. Kunz, *The Chem. Rec.*, **2004**, *3*, 308–321.
- [10] S. Jaracz, J. Chen, L. V. Kuznetsova, I. Ojima, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5043–5054.
- [11] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2000**, *39*, 836–863.
- [12] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston and H. I. Scher, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 4292–4298.
- [13] a) X. Chen, G. S. Lee, A. Zettl, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6111–6116. b) D. P. Galonic, D. Y. Gin, *Nature*, **2007**, *446*, 1000–1007. c) H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 5021–5034. d) D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2005**, *4*, 477–488.
- [14] a) Y. Yeh, R. E. Feeney, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 601–617. b) R. N. Ben, *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 161–166.
- [15] Y. Tachibana, G. L. Fletcher, N. Fujitani, S. Tsuda, K. Monde, S. I. Nishimura, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, *43*, 856–862.
- [16] G. W. Hart, M. P. Housley, C. Slawson, *Nature*, **2007**, *446*, 1017–1022.
- [17] T. Buskas, S. Ingale, G. J. Boons, *Glycobiology*, **2006**, *16*, 113R–136R.
- [18] a) L. Shao, Y. Luo, D. J. Moloney, R. S. Haltiwanger, *Glycobiology*, **2002**, *12*, 763–770. b) R. J. Harris, M. W. Spellman, *Glycobiology*, **1993**, *3*, 219–224.
- [19] K. Bruckner, L. Perez, H. Clausen, S. Cohen, *Nature*, **2000**, *406*, 411–415.
- [20] D. M. Coltart, A. K. Royyuru, L. J. Williams, P. W. Glunz, D. Sames, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X. T. Chen, S. J. Danishefsky, D. H. Live, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 9833–9844.

- [21] J. Schuman, D. X. Qiu, R. R. Koganty, B. M. Longenecker, A. P. Campbell, *Glycoconjugate J.*, **2000**, *17*, 835–848.
- [22] A. Avenazo, J. M. Peregrina, E. San Martín, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 6413–6416.
- [23] F. Corzana, J. H. Busto, S. B. Engelsen, J. Jimenez-Barbero, J. L. Asensio, J. M. Peregrina, A. Avenazo, *Chem. -Eur. J.*, **2006**, *12*, 7864–7871.
- [24] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jimenez-Oses, J. L. Asensio, J. Jimenez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenazo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 14640–14648.
- [25] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jimenez-Oses, M. García de Luis, J. L. Asensio, J. Jimenez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenazo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9458–9467.
- [26] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957–981.
- [27] G. A. Winterfeld, Y. Ito, T. Ogawa, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 1167–1171.
- [28] G. A. Winterfeld, R. R. Schmidt, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2654–2657.
- [29] *The Anomeric Effect and Associated Stereoelectronic Effects* (Ed.: G. R. J. Thatcher), American Chemical Society, Washington, DC, **1993**.
- [30] S. A. Adcock, J. A. McCammon, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 1589–1615.
- [31] L. M. J. Kroonbatenburg, J. Kroon, B. R. Leeftang, J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.*, **1993**, *245*, 21–42.
- [32] B. Bose, S. Zhao, R. Stenutz, F. Cloran, P. B. Bondo, G. Bondo, B. Hertz, I. Carmichael, A. S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 11158–11173.
- [33] D. A. Cumming, J. P. Carver, *Biochemistry*, **1987**, *26*, 6664–6676.
- [34] S. Gnanakaran, A. E. Garcia, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 12555–12557.
- [35] T. Weimar, R. Woods, R. En *NMR spectroscopy of glycoconjugates* (Eds.: J. Jiménez-Barbero, T. Peters), Wiley-VCH: Weinheim, **2002**; pp 111–144.
- [36] D. A. Pearlman, *J. Biomol. NMR*, **1994**, *4*, 1–16.
- [37] C. T. Lee, W. T. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B*, **1988**, *37*, 785–789.
- [38] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 5648–5652.
- [39] L. Biondi, F. Filira, M. Gobbo, E. Pavin, R. Rocchi, *J. Pept. Sci.*, **1998**, *4*, 58–71.
- [40] M. Cudic, H. C. J. Ertl, L. Otvos, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 3859–3870.
- [41] M. Barfield, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 4158–4168.
- [42] F. Cordier, M. Rogowski, S. Grzesiek, A. Bax, *J. Magn. Reson.*, **1999**, *140*, 510–512.
- [43] Y. Mimura, Y. Inoue, N. J. Maeji, R. Chujo, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1989**, *34*, 363–368.
- [44] G. A. Naganagowda, T. L. Gururaja, J. Satyanarayana, M. J. Levine, *J. Pept. Res.*, **1999**, *54*, 290–310.
- [45] L. Kindahl, C. Sandstrom, T. Norberg, L. Kenne, *Carbohydr. Res.*, **2001**, *336*, 319–323.
- [46] *NBO 5.0*. E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, F. Weinhold, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, **2001**.
- [47] A modo de ejemplo ver: a) C. Aydillo, G. Jiménez-Oses, J. H. Busto, J. M. Peregrina, M. M. Zurbano, A. Avenazo, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 4840–4848. b) G. Jimenez-Oses, C. Aydillo, J. H. Busto, M.M. Zurbano, J. M. Peregrina, A. Avenazo, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 5399–5402. c) A. Avenazo, J. H. Busto, N. Canal, J. M. Peregrina, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 330–333. d) A. Avenazo, J. H. Busto, N. Canal, J. M. Peregrina, M. Pérez-Fernández, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 3597–3600. e) A. Avenazo, J. H. Busto, C. Cati-viela, F. Corzana, J. M. Peregrina, D. Sucunza, M. M. Zurbano. *Preparation and synthetic applications of (S)- and (R)-N-Boc-N,O-isopropylidene- $\alpha$ -methylserinals en Targets in Heterocyclic Systems. Chemistry and Properties*. (Eds.: O. A. Attanasi y D. Spinelli), Italian Society of Chemistry, Roma, Vol 6. **2002**, pp. 231–244.

## 225 Aniversario del aislamiento del wolframio

## 2º CONCURSO DE CÓMICS DE MENDELÉEV

DISEÑA TU PROPIO CÓMIC sobre los hermanos Delhuyar, descubridores del Wolframio

## OBJETIVO DEL CONCURSO

La Real Sociedad Española de Química y el Foro Permanente Química y Sociedad organizan este concurso para difundir y promover la vida y obra de Juan José y Fausto Delhuyar, descubridores del elemento químico wolframio, coincidiendo con el 225 aniversario de su aislamiento.

## A QUIÉN VA DIRIGIDO

A estudiantes de enseñanza secundaria, bachillerato y universitarios.

## FORMATO

Haz tu cómic en estilo libre a tamaño DIN A4, en color o en blanco y negro, con un máximo de 8 páginas. Puedes enviarlo en papel o como documento digital, como imagen (jpg o tif) o en formatos pdf o ppt.

Envía tus datos personales (nombre, edad, dirección postal completa, teléfono, correo electrónico, centro de estudios y curso que estás realizando) por separado para garantizar el anonimato.

## JURADO

El jurado estará formado por profesores e investigadores de Química y Ciencias. El jurado valorará la creatividad, así como el rigor científico, los aspectos artísticos y la originalidad. Los cómics quedarán a disposición de los organizadores que podrá publicarlos, con referencia expresa del autor, si lo considera oportuno. El fallo del jurado será inapelable.

## CÓMO PARTICIPAR

Diseña tu propio cómic sobre la época, vida y obra de los hermanos Delhuyar con un máximo de 8 páginas, destacando los acontecimientos más relevantes de estos químicos españoles del siglo XVIII. SE CREATIVO.

Los cómics en formato digital o en papel deben estar en la dirección que figura más abajo antes de las 14:00 h del viernes, día 20 de junio de 2008.

Lourdes Lozano Real Sociedad Española de Química (RSEQ)  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
Ciudad Universitaria, s/n - 28040 MADRID  
Tel 91 394 4356  
lourdes.lozano@rseq.org

## Premios

Se concederá un único primer premio de 600 euros en cada una de las tres categorías siguientes:  
Categoría A: Alumnos de secundaria obligatoria  
Categoría B: Alumnos de bachillerato  
Categoría C: Alumnos universitarios

## Entrega de Premios

Los premios se entregarán en la mañana del viernes, 11 de julio de 2008, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de La Rioja en Logroño.

