



Universidad de la República

Facultad de Química

DepBio/DETEMA

Cátedra de Bioquímica/ Grupo de Química y Biología  
Computacional (CCBG)

PEDECIBA-Química

**Diseño racional y síntesis enzimática de  
galactósidos con potencial actividad como  
inhibidores de galectinas**

Mag. Diana Cecilia Porciúncula González

Noviembre 2019





*“Diseño racional y síntesis enzimática de galactósidos con potencial actividad como inhibidores de galectinas”*

Mag. Diana Cecilia Porciúncula González

Tesis entregada para la obtención del título de:

**Doctora en Química**

Universidad de la República

Facultad de Química

Departamento de Biociencias (DepBio) - Cátedra de Bioquímica

Departamento de Teoría y Experimentación de la Materia (DETEMA) –  
Grupo de Química y Biología Computacional (CCBG)

Directoras de Tesis:

Dra. Cecilia Giacomini

Dra. Gabriela Irazoqui

Dra. Patricia Saenz-Méndez

Montevideo, Noviembre de 2019.



*Esta tesis está dedicada a mis amores: Franco Y Andrés*





## AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis fue posible gracias al aporte (directo o indirecto) de muchos.

*Primero que nada quiero agradecer a quienes formaron parte directa de este proyecto:*

A mis “madres académicas” Gabi, Ceci y Paty. Si hay algo que destacar es que esta tesis fue trabajo en equipo.

Gracias por el amor que le pusieron a este proyecto, por todas las charlas compartidas, por donarme parte de su tiempo personal para poder llegar a las metas planteadas. Por entenderme y apoyarme en esos momentos en los que la tesis no pudo ser prioridad. Gracias por palanquearme en mis debilidades, (también por los rezongos!!!) y por darme para adelante en mis fortalezas. Por no dejarme que aflojara. Por hacer que este proyecto hermoso (y trabajoso) fuera posible. Gracias por ser tan lindas personas.

A los compañeros de bioquímica por estar siempre en las buenas y en las malas, por los mates, cafés y las cosas ricas compartidas, por hacer que venir a trabajar se convierta en algo re lindo.

A Ale y Kari (Drs. Alejandro Cagnoni y Karina Mariño) por recibirme en su laboratorio, por enseñarme mucho de galectinas, SPA e ITC. Y no menos importante por hacerme sentir muy bien (entre mates y facturas) durante ambas estadías.

A Carolina Fontana por su maravilloso trabajo con el RMN de carbohidratos.

A Silvia (Dra Silvia Soulé) por hacerme ver que tenía que hacer el doctorado, por aconsejarme no abandonar cuando tuve dudas, y lo más importante por sembrar en mí el amor por los carbohidratos.

A los compañeros del Grupo de Química y Biología Computacional, en particular a Aline por la compañía y la mano en las últimas locas etapas del doctorado.

*A su vez quiero agradecer a mi familia y amigos que me han apoyado de distintas formas:*

**A Franco** por ser lo más hermoso de mi vida, por tener la sonrisa más linda del mundo, por quererme, por bancarse que no le diera pelota durante la escritura de la tesis, por mis pasantías. Gracias por ser quien sos.

**A Andrés**, mi amor, por ser la persona más generosa del mundo, por aguantarme, por aprender obligado de galectinas y carbohidratos durante todo este proceso, por quererme y apoyarme siempre. Por tomarte muchas veces este proyecto de tesis un proyecto familiar. Por hacerte cargo de la casa y hacer de psicólogo cuando las cosas no salían bien. Por compartir tu vida conmigo. Te amo mucho.

A mamá y mi tía Iris por mostrarme que el sacrificarse por lo que uno quiere vale la pena. Por enseñarme la importancia de la educación y apostar siempre a que me formara. Por cuidarme y quererme toda mi vida.

A mis suegros, Chiquita y Billy por ser tan generosos, por su gran apoyo siempre, y mas, durante la escritura de esta tesis.

A mis hermanos Diego, Vicky Martín y Emi, y a mi sobrino Lucas por perdonar mis ausencias, por quererme a pesar de todo.

A mis amigos, los bioquímicos, Gabi P, Lari, Majo, Stefi y Laura y los de la vida Noe, Gabi L. y Alito. Gracias por todos los momentos compartidos, y por apoyarme siempre.

A mis amores en el cielo...

A Sofi por haberme acompañado una parte del camino. Por enseñarme a valorar la vida.

A mis abuelos Armando y Rosa, porque se que hubieran estado orgullosos y por haberme enseñado el valor de la educación.

#### **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Finalmente, agradecer a las instituciones que apoyaron este proyecto de tesis.

En primer lugar a la Facultad de Química por ser el lugar donde me realicé esta tesis. A CSIC y PEDECIBA, por los apoyos económicos brindados tanto para reactivos e insumos como para la realización de las pasantías y asistencia a congresos.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, por la beca de Doctorado otorgada.



## RESUMEN

Las galectinas, son proteínas que poseen alta afinidad por  $\beta$ -galactósidos. Dichas proteínas poseen un dominio conservado denominado Dominio de Reconocimiento a Carbohidrato (DRC), donde se da la interacción con sus ligandos. En particular las galectinas 1 y 3 han sido ampliamente estudiadas, ya que se encuentran vinculadas a distintos procesos biológicos, entre otros adhesión celular, extravasación celular y metástasis, favoreciendo el desarrollo tumoral. Por esta razón se han convertido en un blanco prometedor para la terapia contra el cáncer ya que se podría inhibir su capacidad pro-tumorogénica bloqueando el sitio de unión a carbohidratos con glicósidos que compitan con sus ligandos naturales.

En este marco el objetivo general de esta tesis fue establecer una estrategia que permitiera el diseño racional de inhibidores de galectinas con potencial actividad antitumoral. Para ello se propuso el desarrollo *in silico* de modelos computacionales, capaces de predecir la naturaleza de la interacción entre los ligandos seleccionados y las galectinas. Por otro lado se realizó la síntesis enzimática de dichos compuestos y la evaluación de su actividad biológica mediante estudios *in vitro*.

Se sintetizaron enzimáticamente cinco galactósidos:  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**2**), la mezcla  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**3**) y  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**4**),  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAcp (**6**) y el galactósido de carácter aromático bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido (**5**), aplicando el sistema de transglicosilación catalizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Posteriormente se estudió la afinidad y especificidad de unión *in silico* de las galectinas 1 y 3 y los  $\beta$ -galacto-compuestos sintetizados junto con otros disacáridos de origen comercial. Para ello se aplicaron distintas simulaciones de Dinámica Molecular, en combinación con experimentos de Docking Molecular, en la búsqueda de generar modelos computacionales capaces de reproducir y predecir las interacciones entre las galectinas y sus ligandos. A su vez, se estimaron las energías libres de unión ( $\Delta G$ ) de cada complejo galectina-ligando obtenido.

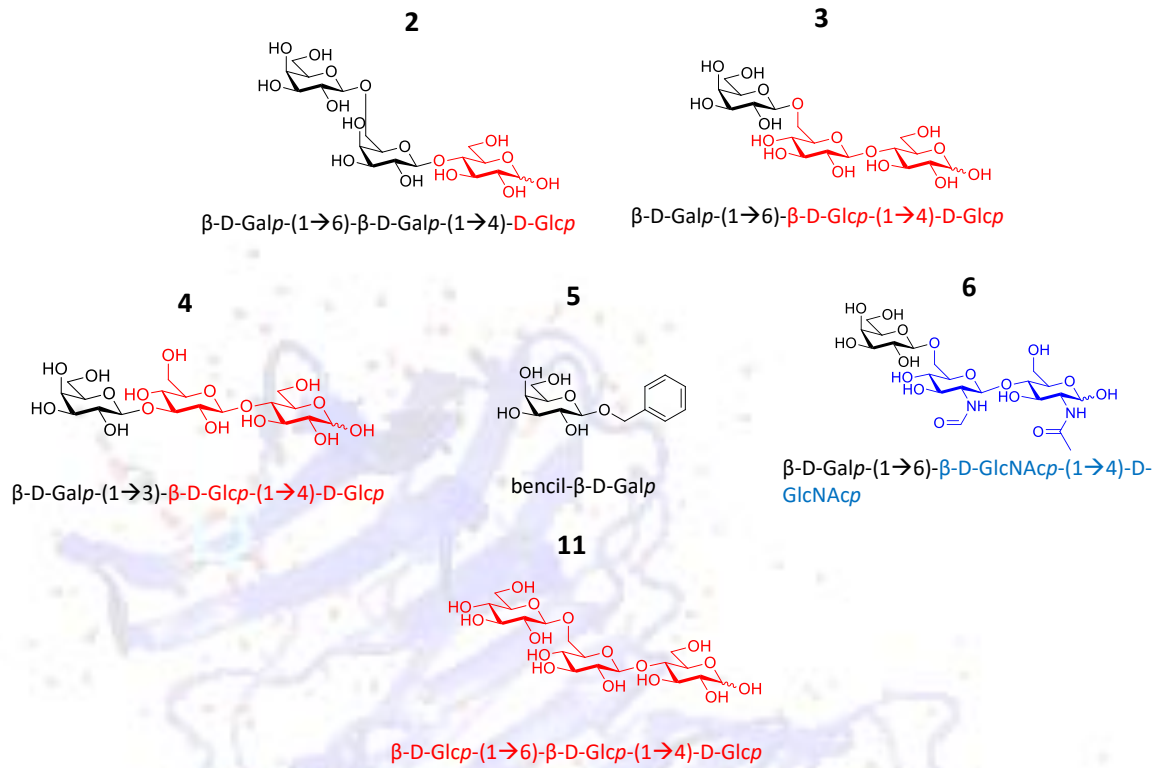
Con el objetivo de validar los modelos teóricos obtenidos, se estudió la interacción galectina-ligando mediante dos ensayos biológicos *in vitro*: ensayo en fase sólida e ITC.

Los resultados obtenidos, mostraron una óptima correlación entre los resultados experimentales y teóricos, validando los modelos generados previamente. A pesar de la complejidad intrínseca del modelado de carbohidratos y lo expuesto al disolvente del DRC, en esta tesis se obtuvieron modelos teóricos preliminares, capaces de sortear dichas dificultades. Si bien los ligandos sintetizados no mostraron afinidades superiores a las de los ligandos de referencia (lactosa y *N*-acetil-lactosamina), los resultados obtenidos, constituyen un estudio detallado de la naturaleza de dichas interacciones. De hecho se pudieron establecer diversos aspectos de la naturaleza química del ligando que influyen en la interacción con la galectina. Por un lado la naturaleza del enlace entre la galactosa y el segundo azúcar es fundamental, siendo los enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) los que presentan mayor afinidad. Otro aspecto a tener en cuenta es la identidad de dicho azúcar, determinándose que la presencia del grupo *N*-acetilo en el carbono 2 del residuo glucopiránosico, mejora la interacción con el subsitio D de las galectinas, tanto 1 como 3. Finalmente, la adición de un tercer azúcar no resulta beneficioso respecto a la energía de unión. Esto no quiere decir que ligandos más grandes no puedan ser más afines por la galectina, sino que en principio estructuras de tipo trisacáridos no sería suficiente y no evidencian diferencias respecto a los disacáridos.

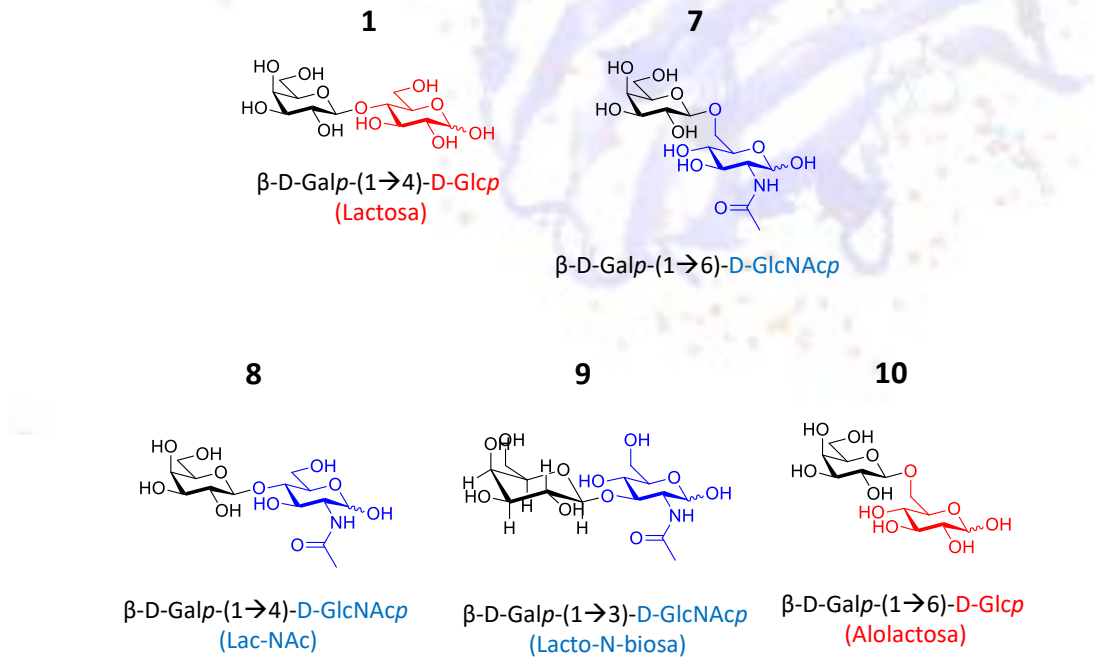
Finalmente los modelos teóricos generados en esta tesis representan un importante insumo para el diseño y síntesis de inhibidores de galectinas más potentes.

# LISTA DE LIGANDOS QUE APARECEN EN ESTA TESIS

## Sintetizados enzimáticamente



## Obtenidos comercialmente





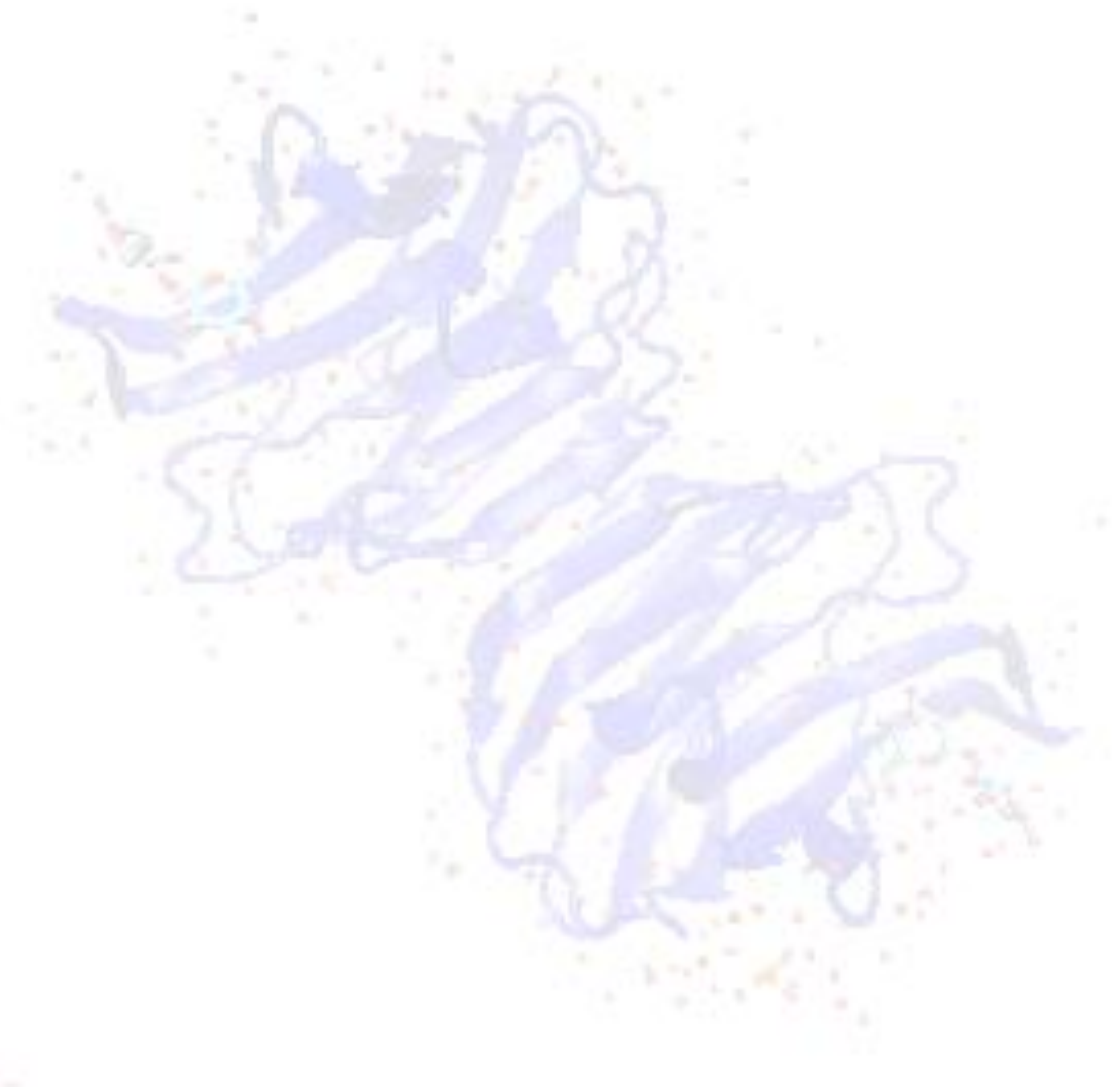
## Índice

<b>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1.1. Estructura y función de los carbohidratos .....	3
1.1.2. Lectinas.....	7
1.1.3 Galectinas.....	8
1.1.4. Estrategias enzimáticas para la síntesis de galactósidos .....	15
1.1.5. Galactosidasas.....	16
1.1.6 Métodos para el estudio teórico de las interacciones galectina-carbohidrato .....	20
1.2. OBJETIVOS.....	32
1.3. BIBLIOGRAFÍA.....	34
<b>CAPÍTULO 2:</b> .....	39
<b>Materiales y Métodos</b> .....	39
2.1 MATERIALES .....	41
2.1.1. Proteínas .....	41
2.1.2. Reactivos .....	41
2.1.3. Programas .....	41
2.2. MÉTODOS.....	41
2.2.1. Preparación del extracto de enzima $\beta$ -galactosidasa de <i>A. oryzae</i> .....	41
2.2.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	42
2.2.3. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa.....	42
2.2.4. Evaluación de la actividad $\beta$ -glucosidasa en el extracto de la enzima $\beta$ -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	42
2.2.5. Síntesis de los trisacáridos y galactósidos .....	44
2.2.6 Métodos generales de análisis, identificación y purificación.....	47
2.2.7. Estudios computacionales.....	48
2.2.8. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos.....	51
2.3. BIBLIOGRAFÍA.....	53
<b>CAPÍTULO 3:</b> .....	53
<b>Síntesis enzimática de galactocompuestos</b> .....	53
3.1. INTRODUCCIÓN .....	55
3.2. RESULTADOS .....	57
3.2.1. Síntesis de trisacáridos.....	57

3.2.2. Síntesis de galactósidos de carácter aromático .....	72
3.2.3. Análisis de pureza de la enzima $\beta$ -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	75
3.3. DISCUSIÓN.....	77
3.4. BIBLIOGRAFÍA.....	80
Capítulo 4: .....	83
Desarrollo del modelo teórico de interacción galectina-carbohidrato.....	83
4.1. INTRODUCCIÓN .....	85
4.2. RESULTADOS .....	87
4.2.1. Preparación de galectinas. ....	88
4.2.2. Estudios de dinámica molecular en hGal-1 y –hGal-3.....	92
4.2.3. Generación de modelos tridimensionales de los ligandos.....	102
4.2.4. Docking molecular.....	104
4.3. DISCUSIÓN.....	110
4.4. BIBLIOGRAFÍA.....	113
Capítulo 5: .....	115
Estudio de las interacciones galectina-galactocompuestos.....	115
5.1. INTRODUCCIÓN .....	117
5.2. RESULTADOS .....	121
5.2.1. Análisis de la interacción galectina-ligando mediante ensayo en fase sólida.....	121
5.2.2. Estudios teóricos de interacción galectina-ligando mediante docking molecular..	124
5.2.3. Análisis de interacción hGal-1 ligando mediante Titulación Calorimétrica Isotérmica .....	133
5.3. DISCUSIÓN.....	134
5.4. BIBLIOGRAFÍA.....	138
Capítulo 6: .....	141
Consideraciones Finales .....	141
6.1. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES .....	143
6.2. PERSPECTIVAS .....	146
6.3. BIBLIOGRAFÍA.....	148
ANEXO 3 .....	149
ANEXO 4 .....	159
PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS .....	189



# Capítulo 1: INTRODUCCIÓN





## 1.1. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años el avance en el estudio de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos ha captado la atención de los investigadores dejando relegados a los carbohidratos, entre otras razones por su complejidad estructural. Sin embargo en las últimas décadas su estudio ha tenido un incremento significativo generando un cambio en el paradigma clásico, en el cual se creía que la transmisión de información biológica se daba solamente desde el ADN al ARN, y de ahí a las proteínas. El enfoque actual es más complejo donde se incluye y valoriza a los carbohidratos y glicoconjugados como parte de la transmisión de información biológica <sup>1</sup>.

### 1.1.1. Estructura y función de los carbohidratos

Los carbohidratos son una de las moléculas orgánicas más abundantes en la naturaleza<sup>2</sup>. El término carbohidrato o hidratos de carbono hace referencia a su fórmula empírica  $C_nH_{2n}O_n$ . Desde el punto de vista químico se trata de polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas <sup>3</sup>, siendo los más simples los monosacáridos (Figura 1.1). Estos están formados por distinto número de átomos de carbono, siendo los más frecuentes entre 4 y 7 átomos de carbono. Generalmente los monosacáridos formados por 6 átomos de carbono se ciclan formando piranosas o furanosas <sup>4</sup>. La geometría más común de una piranosa es la conformación silla. Sin embargo, dependiendo de la orientación, naturaleza y sustituyentes del azúcar, el mismo puede adoptar otras conformaciones como bote, bote torcido (skew), media silla o sobre (envelope) <sup>4,5</sup>.

Los monosacáridos pueden unirse entre sí formando carbohidratos más complejos como los disacáridos, trisacáridos, etc. u oligosacáridos, los cuales pueden ser lineales o ramificados. La unión entre monosacáridos se da a través de *enlaces glicosídicos*. El tipo de enlace glicosídico puede ser determinante en algunas de las propiedades del azúcar resultante. Los enlaces *O*-glicosídicos se forman cuando el oxígeno del carbono anomérico de un monosacárido se une a un hidroxilo secundario o primario de otro monosacárido, formando un enlace acetal, sensible a ácidos y bases.

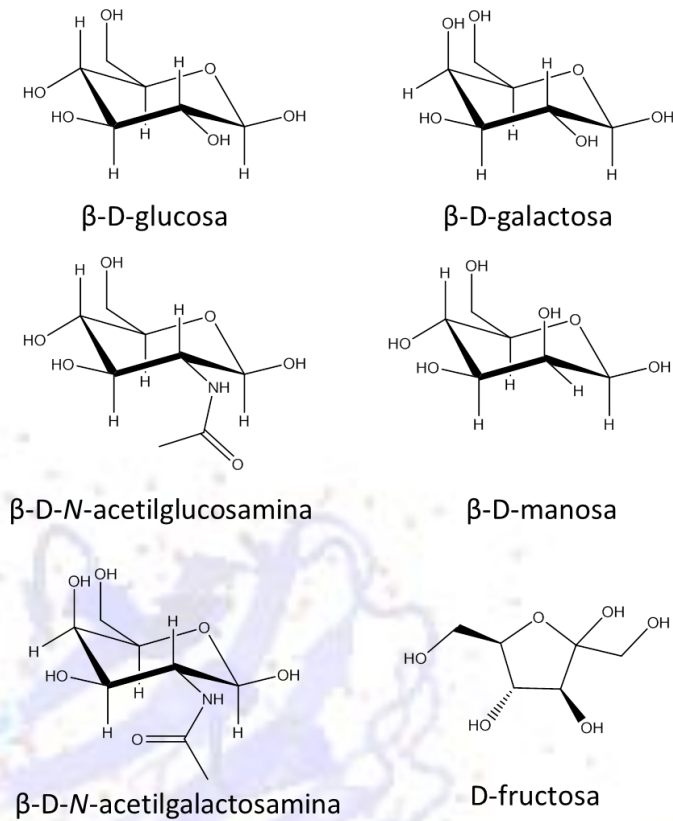


Figura 1.1. Algunos de los monosacáridos más frecuentes en la naturaleza

Los azúcares presentan ángulos diedros característicos cuya variación, provoca cambios conformacionales que modifican sus propiedades estructurales y hasta funcionales. Los ángulos diedros característicos de los azúcares son  $\psi$  y  $\phi$ , los cuales forman parte de los enlaces glicosídicos y  $\omega$  que corresponde al ángulo diedro formado por O5-C5-C6-O6 (Figura 1.2). El diedro  $\omega$  puede adoptar distintos valores lo que se conoce como efecto gauche<sup>3,4,6</sup>.

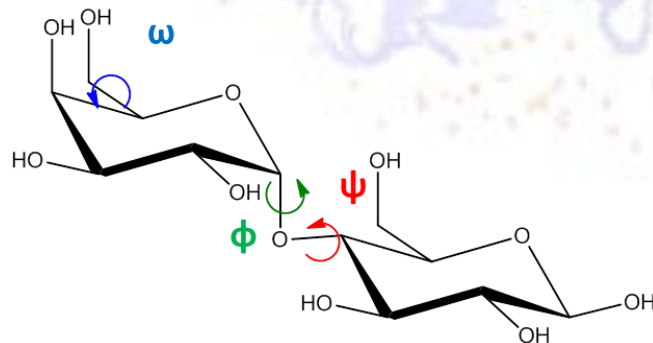


Figura 1.2. Ángulos de torsión  $\phi$ ,  $\psi$  y  $\omega$  en un disacárido (Lactosa).

Si bien los azúcares son moléculas con carácter hidrofílico debido a sus múltiples hidroxilos, cuando se encuentran en forma piranosa, se observan zonas hidrofóbicas,

generalmente a nivel de la cara B de dicha molécula (dependiendo de la identidad del azúcar). Cuando se mira el anillo piranósico a través de una línea imaginaria que lo atraviesa, ordenando los sustituyentes en sentido horario, la cara A es la que queda por encima del anillo y la cara B por debajo (Figura 1.3) <sup>4,7</sup>.

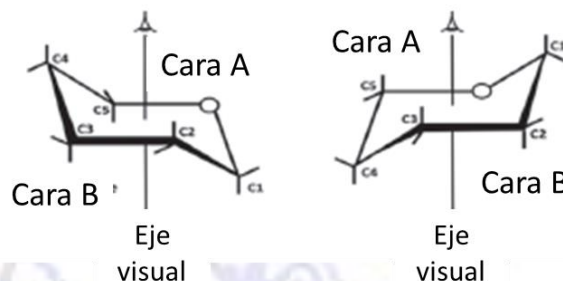


Figura 1.3. Esquema de las caras A y B de una piranosa (Adaptado de Kumari et al 2012) <sup>7</sup>

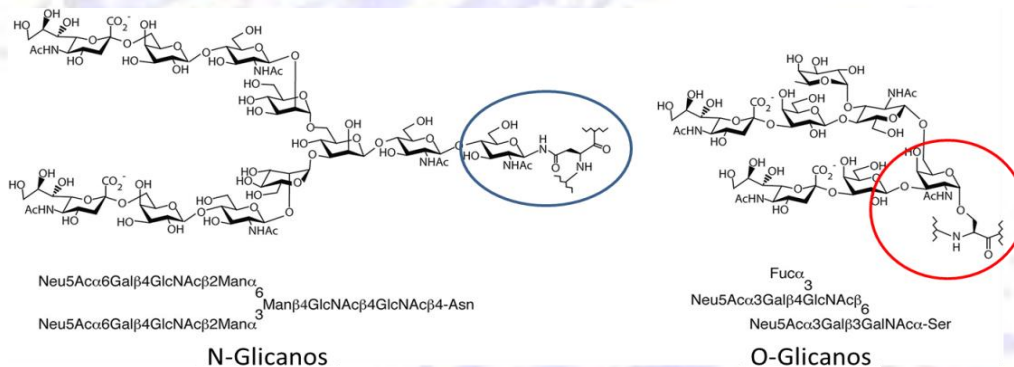
Los **glicanos** son oligosacáridos formados por distintos monosacáridos unidos entre sí, que pueden encontrarse unidos covalentemente a una proteína, lípido o esfingolípido, dando lugar a las glicoproteínas, glicolípidos o glicoesfingolípidos, respectivamente. La complejidad y diversidad estructural de los carbohidratos en los sistemas vivos está dada por la identidad de los monosacáridos que lo componen, la conformación de los carbonos anoméricos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), la variedad de enlaces posibles (1-1, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-6) y la longitud del oligosacárido formado. Esto hace que sean enormes las posibilidades de formar diferentes glicanos. Estos glicanos tendrán propiedades físicas diferentes, e incluso no serán degradados por las mismas enzimas en el metabolismo.

La diversidad de los glicanos es superior a la de los péptidos. A modo de ejemplo, 4 aminoácidos pueden formar 24 combinaciones distintas de tetrapéptidos, mientras que cuatro monosacáridos distintos pueden llegar a formar más de 30000 tetrasacáridos diferentes (teniendo en cuenta la variedad de enlaces posibles sumado al orden en que se unan dichos monosacáridos) <sup>8</sup>.

Esta variedad estructural es la responsable de diversas funciones fundamentales para la célula. De hecho, los glicanos están involucrados tanto en procesos fisiológicos normales como patológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, diferenciación y crecimiento celular, reconocimiento célula-célula, señalización, tráfico y localización celular, interacción huésped patógeno durante la infección, desarrollo de la respuesta

inmune entre otros. Incluso es posible observar variación en los niveles de expresión de estos glicanos durante el desarrollo de estos procesos <sup>2</sup>.

Por lo tanto, a pesar de que los glicanos no están codificados en el genoma, poseen mucha información de relevancia biológica. Éstos se integran a las proteínas como parte de las modificaciones co-traduccionales o pos-traduccionales en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, por la acción de diversas glicosiltransferasas y glicosidasas <sup>1</sup>. Se encuentran unidos a las proteínas mediante enlaces glicosídicos siendo los más frecuentes los *N*-glicanos y los *O*-glicanos <sup>9</sup>. El primero de ellos se forma a partir de la unión de un residuo de *N*-acetilglucosamina al grupo amida de un residuo de asparagina (*N-Linked*). Dicho residuo, pertenece a una secuencia Asn-X-Ser (Thr), donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina. El segundo tipo de enlace involucra la unión del carbono 1 de la *N*-acetilgalactosamina al grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina (*O-Linked*) <sup>10</sup> (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Tipos de unión entre glicanos y glicoproteínas (Extraído de Essentials of Glycobiology 3rd Ed.)<sup>11</sup>

Los *N*-glicanos poseen un glicocore característico formado por la secuencia  $\text{Man}\alpha\text{1-3}(\text{Man}\alpha\text{1-6})\text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn-X-Ser/Thr}$ . Dependiendo de cómo continúe el core a lo largo de las ramificaciones del glicano, se clasifican en tres tipos: 1- Oligomanosa: en el cual las extensión solo contiene manosa; 2- Complejos: donde las dos manosas del core están sustituidas por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y pueden estar elongadas con residuos β-galactosídicos y posteriormente por residuos de *N*-acetil-D-lactosamina (LacNAc) que a su vez pueden estar sialiladas; y 3- Híbridos: en el cual la antena correspondiente a la ramificación α1-6 continua solo con manosa y la ramificación α1-3 con GlcNAc (Figura 1.5A) <sup>12</sup>.

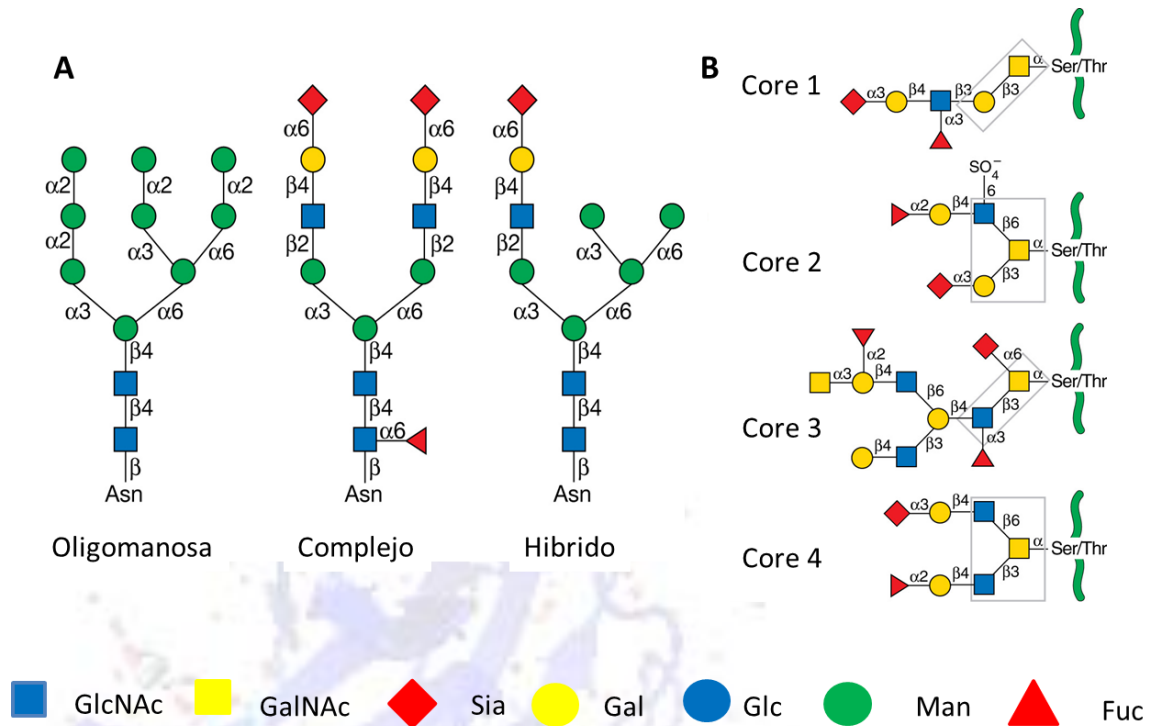


Figura 1.5. A: N-glicanos; B: O-Glicanos (Adaptado de Essentials of Glycobiology 3rd. Ed. <sup>11</sup>)

Respecto a los O-glicanos el residuo de O-GalNAc unido a Ser o Thr se puede extender mediante el agregado de residuos de Gal  $\beta$ 1-3 formando el glicocore más común Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr (core 1). Luego se encuentran el core 2, que presenta la secuencia GlcNAc $\beta$ 1-6(Gal $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ Ser/Thr, el Core 3 GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr (menos común) y el core 4 con la secuencia GlcNAc $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc $\alpha$ Ser/Thr (Figura 1.5B). Los O-glicanos con core de tipo 1 y 2 se encuentran fundamentalmente en las glicoproteínas y mucinas de muchos tipos de células. Sin embargo, los de tipo 3 y 4 están más restringidos a glicoproteínas gastrointestinales y de los tejidos bronquiales <sup>11</sup>.

La alteración en la expresión de los glicanos de la superficie celular está involucrada, entre otros, en la malignidad de las células tumorales, así como en la facilidad de las mismas para migrar hacia otros tejidos generando metástasis.

### 1.1.2. Lectinas

Si bien las lectinas han sido estudiadas desde finales del siglo XIX, no fue sino hasta el año 1954 cuando los investigadores Boyd y Shapleigh acuñaron el término "lectina" por primera vez para hablar de estas proteínas. La palabra lectina viene del latín

“*legere*” (tomar o seleccionar)<sup>13</sup>. Comúnmente han sido llamadas también aglutininas, debido a la propiedad que poseen de aglutinar distintas glicoproteínas.

Las lectinas pertenecen al grupo de las GBP (*Glycan Binding Proteins*, por sus siglas en inglés)<sup>14</sup>. Son proteínas con capacidad para unirse a carbohidratos de forma no covalente y específica pero no son de origen inmunológico como los anticuerpos. En la naturaleza son ubicuas, se encuentran frecuentemente en la superficie celular, y también intracelularmente<sup>8,15</sup>. Las lectinas son extremadamente específicas, pudiendo detectar diferencias sutiles entre glicanos complejos, lo que permite que interaccionen con glicanos de la superficie celular, unidos a glicoproteínas y/o glicolípidos desencadenando procesos biológicos<sup>8</sup>.

Desde un punto de vista de su relación evolutiva, las lectinas animales se identifican por sus dominios de reconocimiento a carbohidratos (DRCs) y se clasifican en 4 tipos: las galectinas o lectinas de tipo S, las lectinas del tipo C, las del tipo P, y las del tipo I. Dentro de las lectinas del tipo C se encuentran las selectinas y las lectinas hepáticas; dentro de las del tipo I se encuentran las siglecs (Figura 1.6)<sup>14,16</sup>.

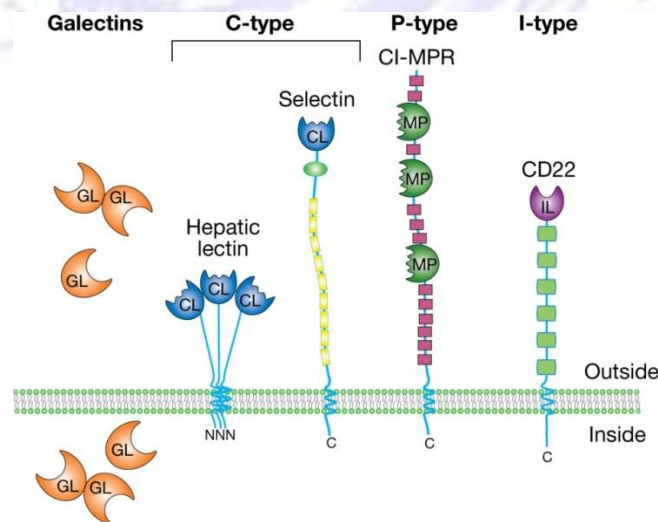


Figura 1.6. Tipos de lectinas animales. (Extraído de *Essentials of Glycobiology 3rd. Ed*)<sup>14</sup>

### 1.1.3 Galectinas

Las galectinas son una familia de lectinas originalmente denominadas lectinas de tipo S en referencia a su dependencia de la presencia de grupos sulfhidrilos, la presencia de residuos de cisteína libres y del hecho de que fueran solubles. Las mismas poseen una

similitud significativa en la secuencia aminoacídica de sus DRC y son específicas para el reconocimiento por  $\beta$ -galactósidos. El término galectina, fue propuesto por primera vez en el año 1994 por Barondes y colaboradores, para hablar de estas lectinas de origen animal con afinidad por  $\beta$ -galactósidos<sup>17</sup>. Estas constituyen el grupo de lectinas más expresadas en los organismos vertebrados<sup>17,18</sup>.

La familia de las galectinas se compone de 15 miembros subdivididos en tres categorías de acuerdo a su estructura (Figura 1.7)<sup>16,19-21</sup>:

- (1) Las galectinas prototipo, son homodímeros no-covalentes con dos DRC idénticos, uno en cada monómero (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15)
- (2) Las galectinas tándem, están compuestas por dos DRC diferentes unidos por un péptido linker (galectinas 4, 6, 9 y 12)
- (3) Las galectinas quimera, son monómeros con un DRC que pueden formar oligómeros agregándose a través del dominio no-lectina formado por Pro y Gly (galectina 3)<sup>20</sup>.

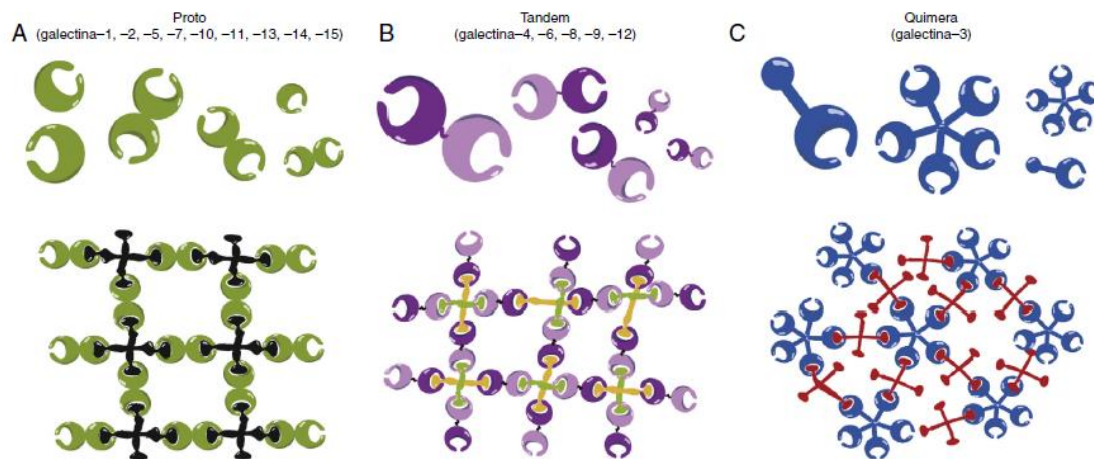


Figura 1.7. Clasificación de galectinas (Extraído de Rabinovich et al. 2012)<sup>20</sup>.

Las galectinas presentan ciertas características comunes como un extremo *N*-terminal acetilado, la ausencia de glicosilación y el requerimiento de condiciones reductoras para desplegar afinidad por carbohidratos<sup>21,22</sup>. Son proteínas solubles, de pequeño tamaño que se pueden encontrar tanto extra como intracelularmente, ya sea en el citosol así como en el núcleo<sup>23</sup>.

La mayoría de las estructuras de las galectinas (a excepción de las galectinas 6, 11, 12, 14 y 15) han sido resueltas y caracterizadas en su mayoría por difracción de rayos X, en algunos caso por resonancia magnética nuclear y sus estructuras completas o parciales (como en el caso de la galectina 3) se encuentran publicadas en el Protein Data Bank <sup>24</sup>.

En todas ellas se reconoce una secuencia altamente conservada, correspondiente a la zona del DRC. Las principales diferencias responsables de la selectividad de las galectinas por los distintos carbohidratos se encuentran en la zona del loop entre las hojas  $\beta 4$  y  $\beta 5$  (Figura 1.8) <sup>25</sup>.

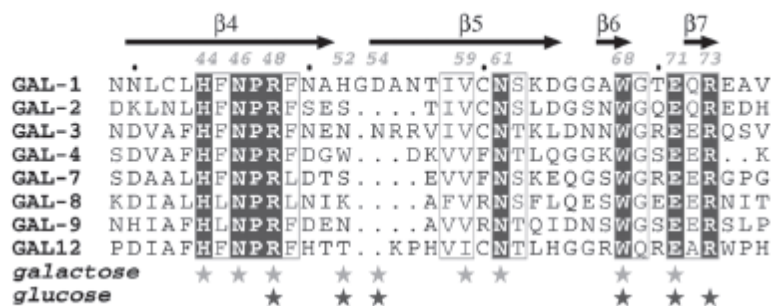


Figura 1.8. Alineamiento de las secuencias de algunas galectinas en la región del DRC (Extraído de Meynier et al. 2009)<sup>25</sup>

Las lectinas interactúan con los carbohidratos mediante el DRC, que constituye una región de la proteína altamente conservada. Esta interacción se da a través de enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals. Los primeros se forman entre los hidroxilos del azúcar y los grupos carboxilo, amida o amino de los residuos aminoácidos de la lectina (Arg, Glu, Asp, His), los que funcionan como dadores/aceptores de hidrógeno. Por otra parte, están las interacciones de van der Waals C/H- $\pi$  que se dan entre la cara apolar del azúcar y un residuo aromático (Trp, Tyr o Phe) que son fundamentales para fijar el azúcar al DRC <sup>15</sup>.

De todos los miembros de la familia de las galectinas las más estudiadas han sido la galectina 1 (Gal-1) y la galectina 3 (Gal-3).

### Galectina 1

La Gal-1 fue la primera de la familia en ser descrita. En mamíferos, se ha encontrado en diferentes órganos como placenta, pulmón, cerebro, corazón, bazo, ganglios linfáticos y próstata <sup>22</sup>. Adicionalmente, Gal-1 es secretada en forma abundante por las



células de la mayoría de los tumores malignos y se encuentra asociada al desarrollo de determinados procesos cancerígenos incluyendo inmunosupresión, angiogénesis, hipoxia y metástasis <sup>26,27</sup>.

Su estructura ha sido caracterizada por difracción de rayos X. Es una galectina prototipo homodimérica, de 135 aminoácidos, con un único DRC en cada monómero de 14 kDa. La interfase del dímero se forma por el extremo N- y C-terminal de cada monómero, y además en ella se encuentra una zona conservada de un “core hidrofóbico”, que favorece la formación del dímero <sup>28</sup>. Su plegamiento involucra un motivo de sándwich compuesto de dos hojas beta antiparalelas conteniendo cinco (F1 a F5) y seis (S1 a S6) hebras  $\beta$  <sup>29-31</sup>. En disolución se encuentra formando un homodímero, siendo una característica distintiva de esta galectina su posibilidad de disociarse a bajas concentraciones (Kd 7  $\mu$ M) reteniendo parte de su capacidad de unir carbohidratos (aunque con bastante menos afinidad) <sup>30</sup>.

El DRC se encuentra localizado en la cara externa de la subunidad, dentro de una cavidad del tamaño de un tetrasacárido (Figura 1.9) <sup>25,30,32</sup>.

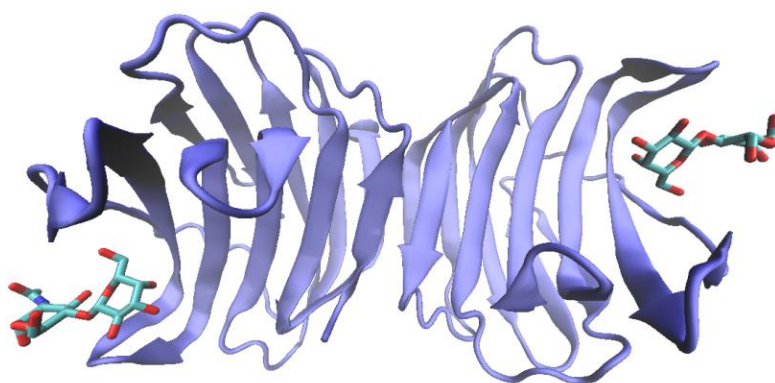
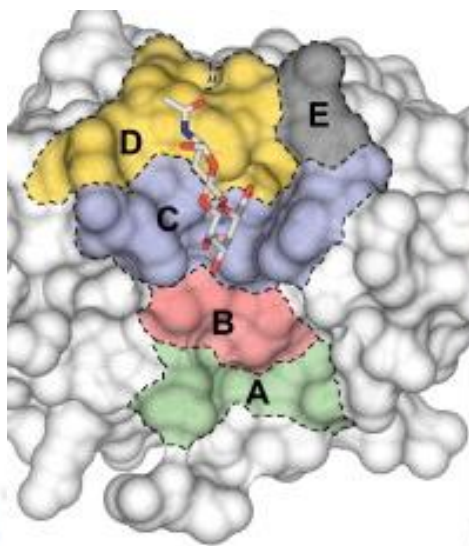


Figura 1.9. Estructura de galectina 1 con LacNAc unida en ambos DRC (pdbID: 1GZW) <sup>28</sup>

El mismo se encuentra formado por cinco subsitios, nombrados de la A a la E (Figura 1.10) que interactúan con los oligosacáridos de las glicoproteínas que actúan como ligandos. El subsitio C (subsitio conservado en todas las galectinas) es el lugar de unión de los  $\beta$ -galactósidos. Por su parte, el subsitio D interactúa con el azúcar unido al carbono anomérico de la galactosa. Los subsitios A-B y D-E presentan diferencias de especificidad en relación a otros tipos de galectina <sup>25,33</sup>.



**Figura 1.10.** Dominio de reconocimiento para carbohidratos (DRC) para galectina 1(Extraído de Meynier et al. 2009) <sup>34</sup>

Los aminoácidos que forman parte de los diferentes subsitios son: **A:** Tyr119, Ala121, Ala122 y Asp123; **B:** Val31, Leu32, Leu34 y Gly35; **C:** His44, Phe45, Asn46, Arg48, His52 y Trp68; **D:** Gly53, Asp54, Val59, Asn61, Glu71 y Arg73; **E:** Gly69 y Thr70 <sup>34</sup>.

Si bien todos los subsitios participarían en la interacción, el análisis de los complejos de galectinas co-cristalizadas con ligandos como lactosa o LacNAc, sugieren que las principales interacciones entre estas proteínas y los glicanos de las glicoproteínas y glicolípidos, se dan fundamentalmente en la región conservada del DRC que corresponde a la región comprendida entre los aminoácidos 44-77 (subsitios C y D). Las principales interacciones, que son tanto hidrofóbicas como de enlaces de hidrógeno, se establecen específicamente con los residuos His44, Asn46, Arg48, His52, Asn61, Trp68, Glu71 y Arg73 <sup>15,31,34</sup>.

### Galectina 3

Como se mencionó previamente, la Gal-3 es la única de tipo quimera encontrada en vertebrados. Es de pequeño tamaño (29-35 kDa) y monomérica (Figura 1.11). Posee tres dominios estructurales. El que posee el extremo amino terminal contiene un sitio de fosforilación de serina, a través del cual se une a otros monómeros. Un segundo dominio conecta el primer dominio con el tercero a través de una secuencia alfa de tipo colágeno (formada por repeticiones de tripéptido Pro-Gly-Tyr). El último dominio

contiene el extremo carboxilo terminal en donde se encuentra el DRC <sup>35</sup>. Al igual que Gal-1, el DRC posee un plegamiento que involucra un motivo de sándwich compuesto de dos hojas beta antiparalelas conteniendo cinco y seis hebras  $\beta$ <sup>36</sup>.

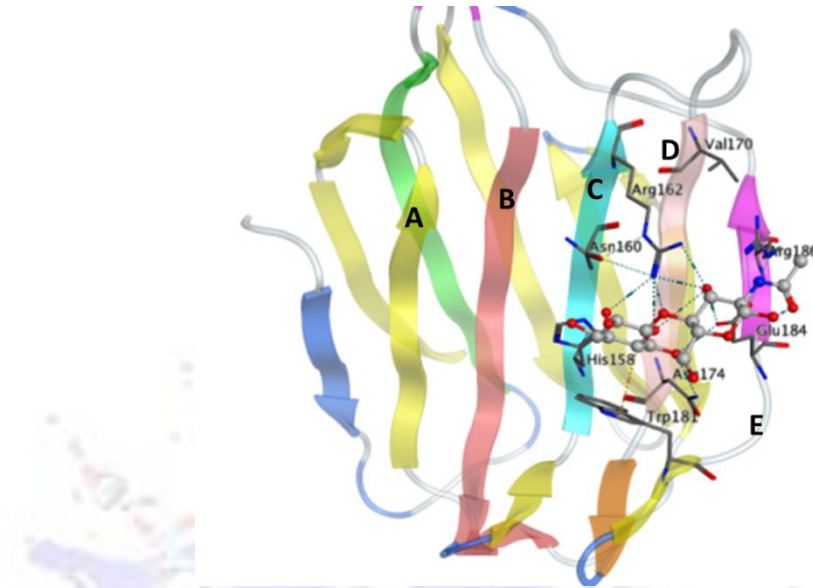


Figura 1.11. Estructura del DRC de Gal-3 humana (pdbID: 1A3K) <sup>36</sup>

Gal-3 se encuentra ubicuamente expresada en humanos, aunque el nivel de expresión varía según el tejido. A diferencia de Gal-1, está presente tanto dentro de las células (en núcleo y citoplasma) así como en el espacio extracelular. La Gal-3 se encuentra habitualmente como monómero. Una vez que se produce la interacción del DRC de un monómero con una glicoproteína o glicolípido, se da la pentamerización con otros monómeros a través del extremo N-terminal, proceso indispensable para llevar a cabo su función <sup>37,38</sup>.

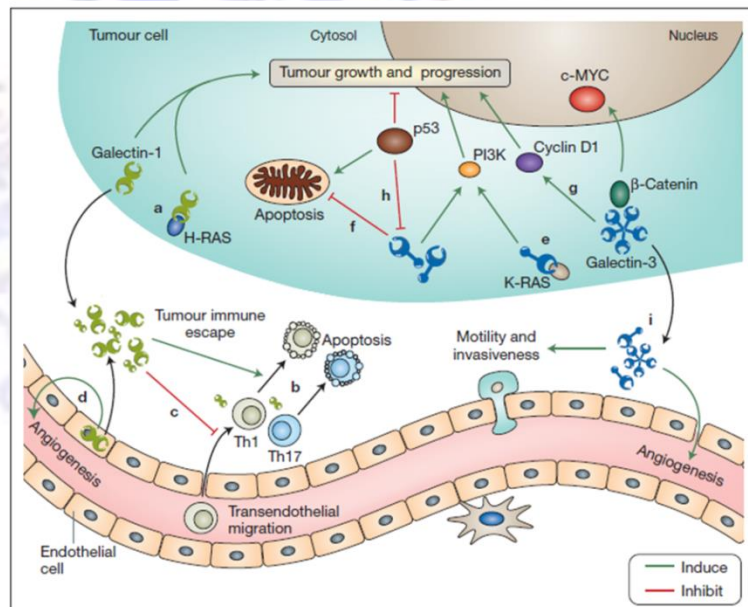
Al igual que Gal-1, el DRC de la Gal-3 está formado por cinco subsitios (A-E). Sin embargo, su estructura presenta aspectos estructurales que la diferencian de otras galectinas <sup>35,39</sup> En analogía con Gal-1 el subsitio **A** está formado por Lys233, Gly235, Ile236 y Ser237; el **B** por Ala146, Leu147, Asp148, Phe149 y Gln150; el **C**: His158, Phe159, Asn160, Arg162 y Trp181; el **D**: Asn166, Asn167, Val172, Asn174, Glu184 y Arg186 y el **E** Gly182 y Arg183.

### Rol de las galectinas 1 y 3

La Gal-1 endógena funciona como un factor promotor de crecimiento, mientras que la agregada de forma exógena específicamente suprime la proliferación celular tumoral <sup>40</sup>. A su vez Gal-1 afecta la interacción de las células tumorales con las células

endoteliales, lo que resulta crítico para los procesos de invasión tisular y metástasis <sup>41</sup>. Se ha observado la acumulación de Gal-1 en los sitios de contacto entre las células de tumores mamarios y el endotelio, lo que sugiere diferentes roles de esta galectina en los procesos de adhesión <sup>42</sup>.

Por su parte la sobreexpresión de Gal-3 se encuentra asociada al desarrollo de procesos inflamatorios, ya que a diferencia de Gal-1 que es antiinflamatoria, Gal-3 es proinflamatoria. Promueve además al desarrollo tumoral, favoreciendo entre otras funciones el crecimiento y adhesión celular <sup>35,43</sup>. A su vez favorece la adhesión a la matriz extracelular provocando el escape del tumor desde el sitio primario a otras zonas del organismo <sup>21</sup>(Figura 1.12).



**Figura 1.12.** Rol de las galectinas 1 y 3 en algunas funciones extra e intracelulares relacionadas con el desarrollo y progresión del tumor (Extraído de Yang et al. 2008)<sup>44</sup>

El rol que cumplen las galectinas en el desarrollo del tumor al igual que en la generación de metástasis las convierte en blancos prometedores para la terapia contra el cáncer ya que se podría inhibir su capacidad pro-tumorogénica bloqueando el sitio de unión a carbohidratos con glicósidos que compitan con sus ligandos naturales <sup>26,27,45-47</sup>.

Algunas de las glicoproteínas con las que interaccionan las Gal-1 y 3 pertenecen a la membrana basal como laminina o fibronectina, receptores de membrana como integrinas  $\alpha7\beta1$  o  $\alpha1\beta1$ , CD43, CD7, CD45 y proteínas de membrana asociadas al lisosoma como LAMP-1, LAMP-2, vitronectina y fibronectina<sup>48-51</sup>. Si bien, los core

glicosídicos de algunas de estas glicoproteínas no están elucidados en su totalidad, se sabe que las galectinas interactúan con los *N*-glicanos complejos, y en particular con aquellos que contienen cadenas terminales de poli-LacNAc <sup>17,52-54</sup>

Teniendo en cuenta la estructura los ligandos naturales es posible diseñar galacto-compuestos con potencial capacidad inhibitoria de galectinas. La mayor parte de los ligandos reportados (antagonistas) presentan estructuras inspiradas en la lactosa o *N*-acetil-lactosamina. Se han sintetizado  $\beta$ -galactósidos de bajo peso molecular, que han mostrado cierta capacidad inhibitoria de Gal-1 y 3 <sup>19,42</sup>. Algunos ejemplos de ellos son 3-(1,2,3-triazol-4-il)-1-tio-galactósidos ( $K_d \sim 107 \times 10^{-6}$  M) <sup>55</sup>, *O*-galactosil-aldoximas ( $K_d \sim 180 \times 10^{-6}$  M) <sup>56</sup> y fenil-tio- $\beta$ -D-galactósidos ( $K_d \sim 140 \times 10^{-6}$  M) <sup>57</sup>, entre otros, aunque con la desventaja de ser poco selectivos para una u otra galectina. Mediante la incorporación de grupos aromáticos en la estructura de ciertos galactósidos, se logró aumentar la selectividad por Gal-3 y con mayor afinidad ( $K_d \sim 1 \times 10^{-6}$  M) <sup>58-65</sup>.

Otra estrategia ha sido el diseño de ligandos multivalentes, simulando lo que ocurre entre las galectinas y las glicoproteínas en la naturaleza. Por ejemplo por funcionalización de aminoácidos no naturales (fenil-bis-alanina y fenil-tris-alanina) con 2-azidoetil- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosido se obtuvo un compuesto con afinidad mejorada hacia Gal-1 <sup>66</sup>. También para Gal-1 se ensayaron compuestos de lactulosa derivatizada con linkers tipo alquilmetilendiamina obteniendo compuestos con afinidad mejorada por esta galectina <sup>19,64,67</sup>.

Muchos de los inhibidores descritos han sido sintetizados mediante estrategias químicas, las cuales son complejas ya que requieren numerosos pasos de protección y desprotección debido a la presencia de múltiples hidroxilos de reactividad similar. Por esa razón surge como alternativa el uso de enzimas, ya que su especificidad y estereoselectividad permite la síntesis de glicósidos en un solo paso de reacción; lo que constituye una alternativa muy atractiva <sup>68,69</sup>.

#### **1.1.4. Estrategias enzimáticas para la síntesis de galactósidos**

Las glicosidasas son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas y constituyen excelentes herramientas para la síntesis de galactósidos. Presentan la ventaja de estar ampliamente distribuidas en la naturaleza y por lo tanto son fácilmente accesibles, a su

vez son robustas, no requieren la presencia de nucleótidos como cofactores como es el caso de las glicosiltransferasas, ni de modificación genética como en el caso de las glicosintasas<sup>69,70</sup>.

En la naturaleza funcionan como hidrolasas catalizando la ruptura de enlaces glicosídicos. Sin embargo, en condiciones adecuadas pueden actuar como transferasas, catalizando la transferencia de una unidad de grupo glicosilo de un compuesto dador (glicósido u oligosacárido) a un nucleófilo que actúa como aceptor. Cuando el aceptor es el agua tiene lugar la hidrólisis del dador. Existen glicosidasas que preservan la estereoquímica del centro anomérico del glicósido y otras que lo invierten. Sin embargo, la mayoría de las glicosidasas utilizadas con fines sintéticos mantienen la configuración del carbono anomérico.

#### 1.1.5. Galactosidasas

Dentro de la familia de las glicosil-hidrolasas se encuentran las  $\beta$ -galactosidasas ( $\beta$ -D-galactosido-galactohidrolasa). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de residuos de galactosa terminales del extremo no reductor de un glicano. De acuerdo a la clasificación de enzimas (clasificación otorgada por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) Enzyme Commission) se clasifica como EC 3.2.1.23. Este sistema clasifica a las enzimas en función de la reacción que catalizan pero no aporta información estructural. Hace algunos años se generó la base de datos CAZy o Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy- <http://www.cazy.org/>) que clasifica a las glicosil-hidrolasas (GH) agrupándolas según su secuencia aminoacídica<sup>71</sup>. De acuerdo a este sistema de clasificación las  $\beta$ -galactosidasas pertenecen al clan GH-A. Este clan comparte un dominio catalítico tipo barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. El clan GH-A está compuesto por 21 familias. Las  $\beta$ -galactosidasas forman parte de las familias GH1, GH2, GH35, GH42, GH59 y GH147. Las más estudiadas son las  $\beta$ -galactosidasas de las familias GH2 y GH35. Mientras que en la familia GH35 se encuentran todas las provienen de organismos eucariotas, a excepción de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Aspergillus nidulans* que pertenecen a la familia GH2 junto con las de origen procariota como *Escherichia coli*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus* y *Thermotoga maritima*.

La enzima  $\beta$ -galactosidasa se encuentra en una amplia multiplicidad de organismos, incluyendo plantas, tejidos animales y microorganismos. La proveniente del hongo *Aspergillus oryzae* es una enzima monomérica extracelular, constituida por 1005 residuos aminoacídicos, con un peso molecular de 112 KDa. Se ha clasificado como glicosil-hidrolasa (GH) perteneciente a la familia GH-35<sup>72</sup>. La estructura cristalizada de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* consiste de seis dominios: el primero desde el residuo Asp40 al Thr397. Este es el dominio catalítico con un plegamiento tipo barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> que contiene dos residuos de ácido glutámico que actúan uno como catalizador acido/base (Glu200), y otro como nucleófilo (Glu298). El segundo dominio comienza en Ala398 hasta Val475, el tercero desde Asp476 a Tyr571, el cuarto dominio comprende los residuos aminoacídicos Asn572 - Ala664 y el quinto dominio está formado por dos fragmentos de la cadena polipeptídica Pro665 a Leu683 y Tyr859 a Tyr1005. Finalmente, el sexto dominio (Pro684–Leu858) se inserta en el quinto. Los dominios 2–6 forman una herradura con cinco estructuras anti-paralelo  $\beta$ -sándwich alrededor del dominio catalítico (Figura 1.13) <sup>71</sup>.

La  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* es estable en un amplio rango de temperatura y pH al igual que en presencia de una serie de co-solventes orgánicos. A su vez presenta excelentes propiedades de transglicosilación. Todas estas características la hacen una excelente elección para la síntesis de galactósidos <sup>73–75</sup>.

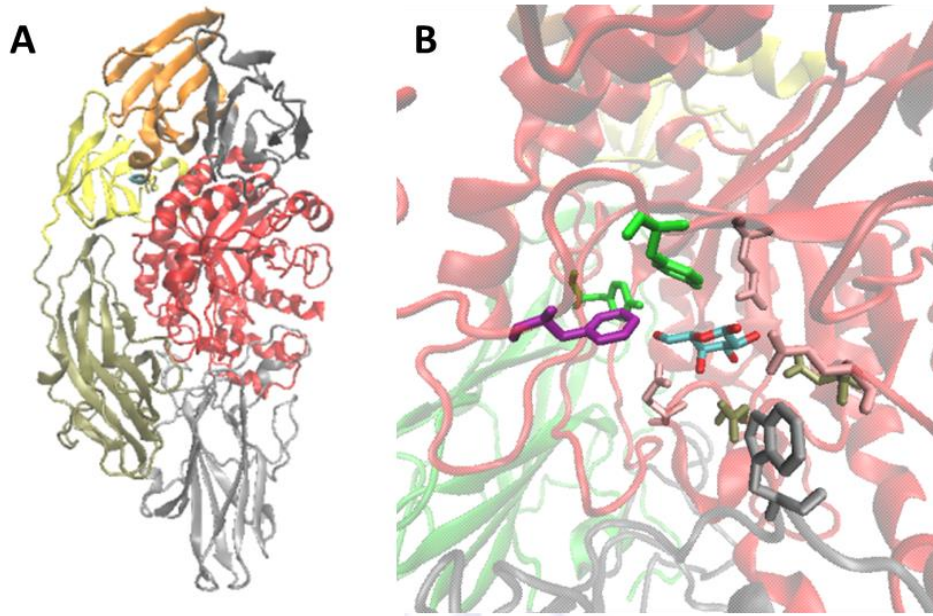


Figura 1.13. A: Estructura de la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. B: Sitio catalítico.

### Mecanismo catalítico

Como se mencionó anteriormente, el sitio activo posee dos residuos de ácido glutámico. Uno de ellos está protonado y colabora en la separación de la aglicona del dador de grupo galactosilo por transferencia de un protón al oxígeno del carbono anomérico, formándose el intermedio ion oxocarbenio-enzima. Simultáneamente, el segundo carboxilato que está desprotonado en la enzima nativa, estabiliza el ion oxonio. A continuación, una molécula de agua lleva a cabo un ataque nucleofílico liberándose la galactosa. El ataque nucleofílico se da en la misma cara donde se liberó el grupo saliente, teniendo lugar un mecanismo de doble desplazamiento, lo que conlleva a la retención de la configuración del centro anomérico <sup>68,71</sup> (Figura 1.14). Cuando en lugar de agua, es otra molécula la que realiza el ataque nucleofílico se libera un galactósido, a través de una reacción de transglicosilación como se describe a continuación.



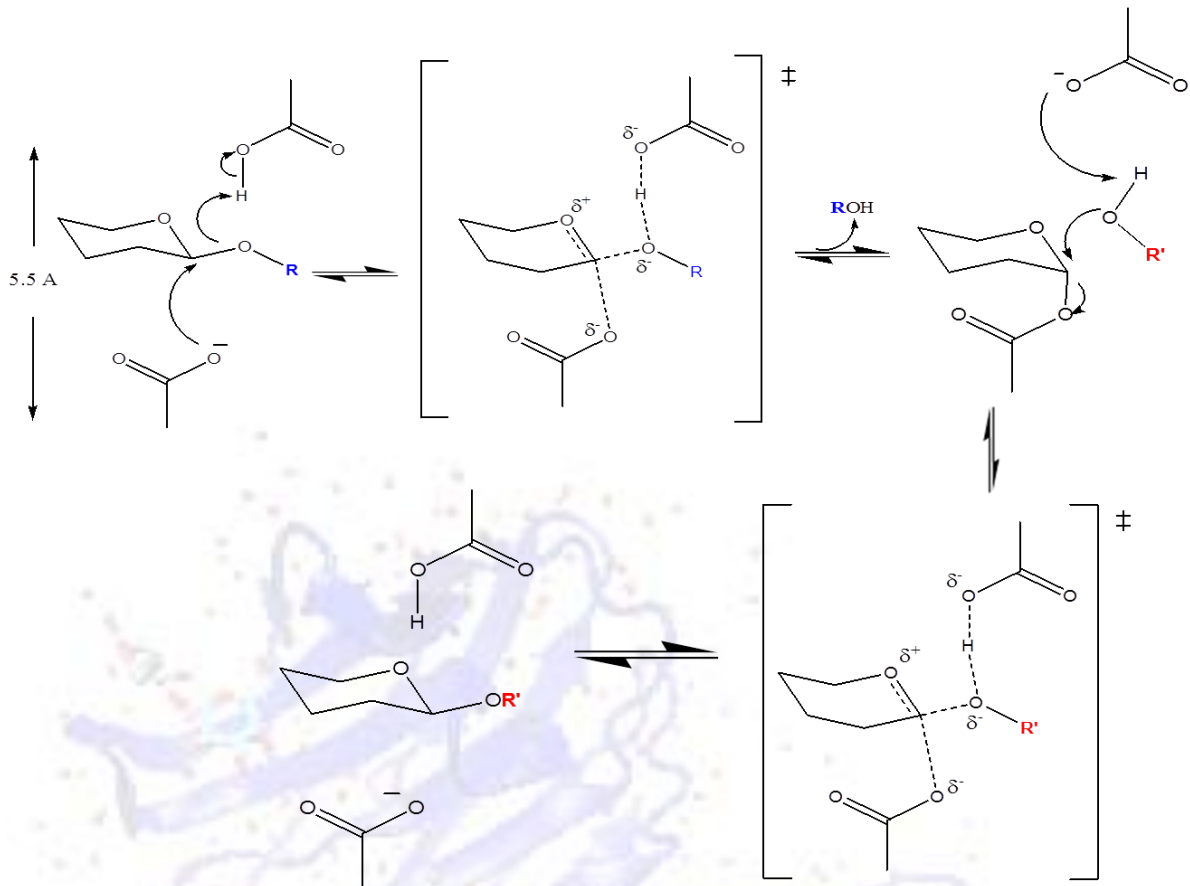


Figura 1.14. Mecanismo catalítico de las β-galactosidasas

### Transgalactosilación enzimática

La generación de galactósidos catalizada por β-galactosidasas cuando estas funcionan como transferasas se conoce como transgalactosilación.

Es un proceso cinéticamente controlado, e involucra distintas reacciones secundarias que compiten con dicha reacción. El mecanismo de acción se da en dos pasos. Primero, el dador de grupo galactosilo (GR), reacciona con la enzima formando el intermedio galactosil-enzima (EG) con la liberación paralela de la aglicona de dicho dador (R). En un segundo paso, un nucleófilo (Y) reacciona con el complejo (EG) generando un nuevo galactósido (GY). En la naturaleza, cuando la lactosa es el dador y el agua el nucleófilo, se da la hidrólisis de lactosa, liberándose glucosa en el primer paso y galactosa en el segundo <sup>68,69</sup>. A su vez, el dador de grupo galactosilo (GR) así como la aglicona (R), dependiendo de su concentración, pueden actuar como aceptores generando un nuevo galactósido o galactooligosacárido (GR<sub>1</sub>). A su vez los galactósidos sintetizados, (GY o GR<sub>1</sub>) pueden actuar como sustrato de la enzima siendo hidrolizados. Por lo tanto,

el rendimiento máximo de obtención de galactósido (GY) está determinado por el balance entre las velocidades de todas las reacciones involucradas. En este contexto, el tiempo de reacción es un parámetro crítico, el cual debe ser optimizado (Figura 1.15).

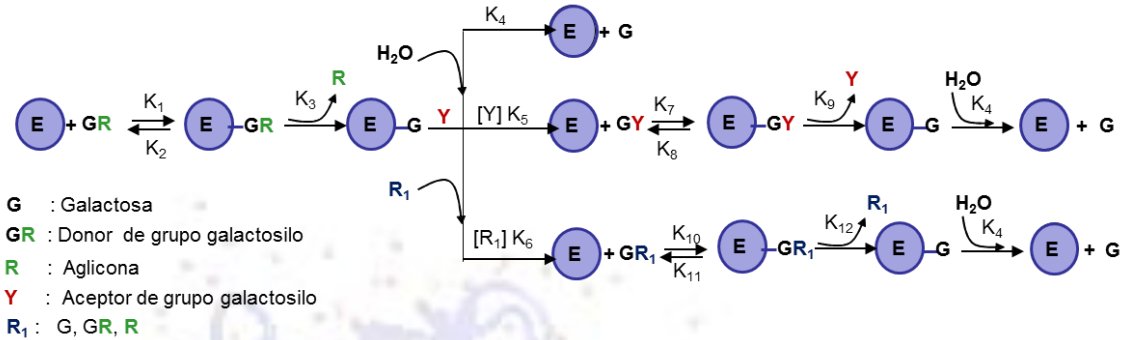


Figura 1.15. Esquema del funcionamiento del sistema de transgalactosilación catalizado por  $\beta$ -galactosidasa

Otros parámetros que deben ser optimizados son la concentración y naturaleza tanto de los aceptores como dadores, así como el origen de la enzima <sup>76-78</sup>.

### 1.1.6 Métodos para el estudio teórico de las interacciones galectina-carbohidrato

Como se mencionó previamente, la síntesis química o enzimática de numerosos galacto-compuestos con diferentes estructuras como potenciales inhibidores de galectinas, está ampliamente reportada <sup>62,66,79</sup>. También más recientemente se ha reportado la síntesis de multímeros y de neoglicoproteínas<sup>62,80</sup>. Todos los procesos de generación de galactósidos conllevan mucho tiempo sin tener la garantía de que finalmente los mismos sean inhibidores efectivos de la galectina blanco. Dado que la capacidad de inhibir una galectina está altamente relacionada con la estructura del ligando y que pequeñas diferencias en la misma pueden llevar a cambios en la afinidad, una estrategia interesante sería realizar un diseño racional de los galactósidos previo a su síntesis. Este diseño puede abordarse utilizando estrategias computacionales.

El uso de estrategias computacionales de Mecánica Molecular ofrece una serie de herramientas capaces de analizar las propiedades estructurales y dinámicas no solo de los carbohidratos sino también aplicado a las interacciones proteína-glicano. Existen

diversos grupos de investigación que han reportado el uso de estas herramientas, aplicado al análisis de las interacciones lectina-carbohidrato <sup>25,34,81-84</sup>.

Si se conoce previamente la estructura de la macromolécula objetivo, que puede provenir por ejemplo de datos de RMN, estructura cristalográfica o modelado por homología, se puede realizar un diseño basado en dicha estructura. Por otro lado, si se conoce la estructura de un ligando con probada actividad biológica, es posible realizar un diseño basado en el ligando. Si se desconoce la estructura tanto del ligando como de la proteína, es posible utilizar herramientas de diseño basado en secuencia. Este se basa en la comparación de secuencias con el fin de predecir la estructura de la macromolécula objetivo para poder obtener ligandos candidatos (*lead discovery*). En lugar de aplicar las técnicas por separado, la tendencia es utilizar varias de estas metodologías combinadas. Dentro de las técnicas computacionales disponibles se encuentran el docking molecular y la dinámica molecular.

A continuación, se exponen los fundamentos de las estrategias computacionales aplicadas en esta tesis.

#### **1.1.6.1 Mecánica molecular**

Si bien la mecánica cuántica es una técnica computacional que proporciona resultados con excelente precisión realizando cálculos a nivel atómico y molecular, la misma no es aplicable a moléculas grandes (miles o cientos de átomos) debido al costo computacional y temporal que eso implicaría. Por el contrario, la mecánica molecular es una herramienta adecuada para el estudio de moléculas de varios miles de átomos. Es un método de cálculo que utiliza la mecánica clásica newtoniana para la obtención de energías y geometrías a nivel atómico y molecular haciendo una serie de aproximaciones.

##### Campo de fuerzas

La herramienta fundamental de la mecánica molecular para calcular la energía de un sistema es el *campo de fuerzas*. Un campo de fuerzas es un conjunto de ecuaciones

que evalúan la energía potencial relacionada con la posición de los átomos de una molécula. Estas ecuaciones se obtienen empíricamente.

A partir de la aproximación de Born-Oppenheimer, que toma el núcleo y la periferia electrónica como entidades independientes, la mecánica molecular considera solo el movimiento de los núcleos de los átomos despreciando el de los electrones, considerando que los mismos se distribuyen óptimamente alrededor de los núcleos. Al realizar esta aproximación, el modelo de mecánica molecular toma a los átomos de una molécula como pequeñas partículas con cierta masa y carga y unidas por resortes. Esto permite calcular la energía del sistema aplicando la ley de Hooke (aproximación armónica) <sup>85</sup>. A partir de estas consideraciones, es posible calcular la energía potencial del sistema mediante la aplicación de campos de fuerzas.

En este método, una molécula se describe en términos de enlaces, ángulos, ángulos diedros e interacciones no-enlazantes (Figura 1.16).

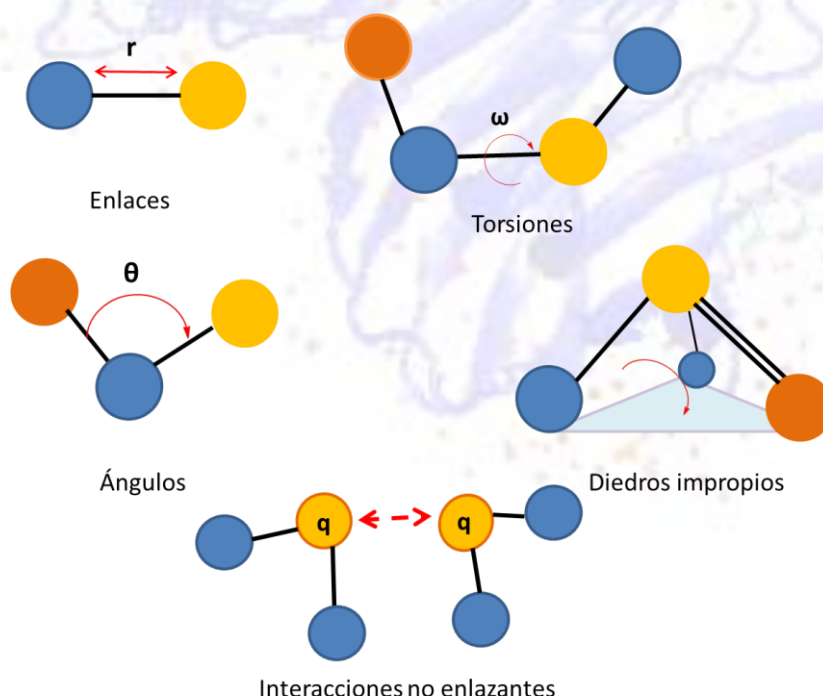


Figura 1.16. Tipos de interacciones entre partículas.

Para calcular la energía del sistema, se realiza la suma aritmética de una serie de energías particulares (Ecuación 1) donde cada término, es una componente del sistema.

$$E_T = E_s + E_b + E_w + E_{nb}$$

Ecuación 1

En esta ecuación la energía total del sistema ( $E_T$ ) es igual a la suma aritmética de varias energías: el primer y segundo término ( $E_s$  y  $E_b$ ) corresponden a la ecuación de Hooke para el cálculo de energía potencial de enlace entre dos partículas (*bond stretching*) y de apertura y cierre de los ángulos (*angle bending*), respectivamente. El tercer término corresponde a las torsiones correspondientes a ángulos diedros propios e impropios ( $E_w$ ) y el último término corresponde a la energía de las interacciones no-enlazantes. Estas interacciones son aquellas que no corresponden a enlaces intra- o intermoleculares, sino más bien a interacciones a través del espacio, dentro de las que encontramos las interacciones de van der Waals y las electrostáticas. El desglose de cada uno de estos términos se observa en el Ecuación 2.

$$E_{total} = \sum_{enlaces} K_l (l - l_0)^2 + \sum_{ángulos} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsiones} \frac{V_n}{2} [1 \pm \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{no\ enlazantes} \left[ \epsilon \left( \left( \frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right]$$

Ecuación 2

En esta ecuación  $E_{total}$  corresponde a la energía total,  $(l-l_0)$  es el estiramiento de los enlaces,  $(\theta-\theta_0)$  la variación en el ángulo de enlaces,  $\omega$  es la rotación de los ángulos diedros,  $\gamma$  es la fase del ángulo y  $n$  la periodicidad. En cuanto a las interacciones no enlazantes, el término  $\epsilon[(r_{0ij}/r_{ij})^{12} - 2 \cdot (r_{0ij}/r_{ij})^6]$  corresponde al potencial de Leonard Jones y el último término al potencial correspondiente a las interacciones electrostáticas (potencial de Coulomb).

### Transferibilidad

La transferibilidad es una propiedad deseable de los campos de fuerzas. El principio de transferibilidad asume que la energía calculada en un campo de fuerzas para un determinado grupo químico, es representativa y puede ser aplicada para predecir la

energía de otras moléculas más grandes compuestas por el mismo tipo de grupo químico. Los métodos de mecánica molecular son empíricos, es decir que las ecuaciones para el cálculo de la energía potencial y los parámetros se ajustan a datos experimentales. Por lo tanto, la transferibilidad debe ser tomada con cierto criterio a la hora de seleccionar el campo de fuerzas a aplicar. Para aplicar esta propiedad se definen “tipos de átomos”.

Cada campo de fuerza, *parametriza* los tipos de átomos en función de su geometría y grupo funcional asignándoles determinados potenciales característicos. Esto permite posteriormente en función de los átomos que componen la molécula en cuestión, calcular la energía global del sistema. Se desprende de lo anterior la importancia de parametrizar adecuadamente cada molécula y de elegir el campo de fuerza que más se adecúe a nuestro sistema de estudio.

Es muy importante tener en cuenta que los modelos, son aproximaciones, que intentan representar la realidad, pero todos tienen un error asociado. Cuanto mejor represente la realidad, mejor modelo será para esa situación experimental. A su vez, no es posible aplicar un mismo campo de fuerzas a todas las situaciones, ya que, dada la multiplicidad de variables, sería errado. Por eso existen diversos campos de fuerza que intentan modelar distintos sistemas. Existen muchísimos ejemplos de familias de campos de fuerza, adecuados para distintos tipos de moléculas, los cuales presentan distinto grado de complejidad. Algunos de los más populares son AMBER <sup>86,87</sup>, CHARMM <sup>88</sup>, y GROMOS <sup>89</sup>. Otros campos de fuerza como OPLS <sup>90</sup>, o GAFF <sup>91</sup> tienen utilidad para simular compuestos orgánicos en presencia de biomacromoléculas. Finalmente, Glycam06 <sup>92</sup> es uno de los campos de fuerzas desarrollado específicamente para carbohidratos.

Dentro de las múltiples técnicas que permiten la evaluación de la interacción entre proteínas y ligandos encontramos el Docking Molecular y la Dinámica Molecular, entre otros. Estas técnicas dependen de aplicar distintos campos de fuerza para realizar sus cálculos.

### 1.1.6.2. Dinámica molecular

La mecánica molecular por si sola no permite apreciar la evolución del sistema en función del tiempo. Sin embargo, la dinámica molecular es una técnica que permite evaluar en función del tiempo, el movimiento de los átomos y las moléculas, mediante integración de las ecuaciones de Newton, empleando los campos de fuerzas generados a partir de la energía potencial del sistema ( $U$ ) (Ecuación 3).

$$F(x, i) = m_i \frac{\delta v_{i,z}}{\delta t} = - \frac{\delta U}{\delta x_i}$$

Ecuación 3

Se genera una ecuación diferencial cuya resolución debe ser numérica y necesita de un algoritmo de integración. Este último utilizará aproximaciones aplicando series de Taylor para su resolución. Dada la posición y velocidad inicial a un tiempo  $t_0$ , el algoritmo deberá calcular las mismas luego de transcurrido un tiempo  $\Delta t$  ( $t_0 + \Delta t$ ). Como resultado de esa integración se obtiene una trayectoria que especifica como varían las posiciones y velocidades de las partículas en el sistema a largo del tiempo de la simulación, utilizando escalas de tiempo muy pequeñas (nano- o picosegundos). Se han desarrollado diversos algoritmos (Velocity Verlet, Beeman, etc.) cuya correcta elección condiciona la confiabilidad del resultado obtenido.

La dinámica molecular permite obtener conformaciones que corresponden a mínimos de energía potencial (es decir energéticamente más favorables). Una desventaja es que presentan cierta dificultad para remontar barreras energéticas, y dado que pueden existir muchos mínimos en una superficie de energía potencial (PES por sus siglas en inglés Potential Energy Surface), no necesariamente el mínimo obtenido será el global (Figura 1.17). La selección adecuada de los parámetros para el experimento, son tan importantes como la calidad de la estructura de partida para realizar la dinámica.

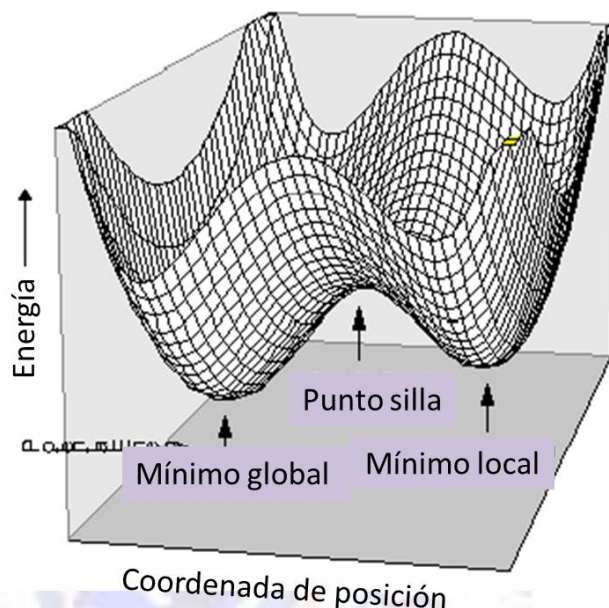


Figura 1.17. Superficie de energía potencial

### 1.1.6.3. Docking Molecular

Es un método para simular y calcular la energía de interacción entre dos moléculas (receptor-ligando; enzima-sustrato). El objetivo es tratar de predecir la conformación y orientación del ligando (pose) formando un complejo con el receptor, así como la energía del complejo formado entre las dos entidades (lo que se conoce como afinidad o energía de unión). Tiene sus orígenes en la década de los ochenta y desde ese momento ha sido una de las herramientas computacionales más utilizadas en el desarrollo de fármacos <sup>93</sup>.

Se pueden hacer distintas aproximaciones, por ejemplo, considerar tanto al ligando como al receptor como entidades rígidas, al ligando flexible y al receptor rígido, o tanto ligando y receptor como flexibles.

Consta principalmente de dos etapas, la primera es una búsqueda conformacional, denominada posicionamiento o “posing” en la cual se obtienen diversas orientaciones posibles de un ligando (*poses*). La segunda, se da a continuación de la primera y consiste en la predicción de la energía de unión (*score*) asociada a cada conformación la cual es evaluada mediante una función de *scoring* <sup>94,95</sup>.



### Etapa de posicionamiento

Existen dos tipos de búsqueda conformacional: sistemática y estocástica.

El método sistemático, se aplica a los experimentos de docking en los que se considera al ligando flexible y se generan todas las posibles conformaciones del ligando unido al receptor explorando los grados de libertad seleccionados para dicho ligando <sup>96</sup>. Esta es una búsqueda exhaustiva y se lleva a cabo rotando los enlaces habilitados para rotar que se han seleccionado en un intervalo dado. Las combinaciones posibles son muchas, dependiendo del tamaño del ligando y el intervalo seleccionado, por lo que usualmente se hacen restricciones de tipo geométricas y químicas. Las conformaciones obtenidas finalmente son filtradas en una etapa posterior de *refinement/optimization* <sup>97</sup>, convergiendo finalmente a una solución de mínima energía. Un inconveniente que presenta este tipo de búsqueda es que, en función del punto de partida, puede que la conformación obtenida corresponda a un mínimo local y no al global en la superficie de energía potencial (Figura 1.17).

Para realizar una búsqueda estocástica existen distintos métodos. En el método Montecarlo, las orientaciones y conformaciones del ligando se obtienen haciendo cambios “al azar” en el ligando. Esos cambios se realizan variando la conformación del mismo, así como rotándolo y trasladándolo en el espacio. El cambio será aceptado o rechazado utilizando para ello una función de probabilidad. Este tipo de modificación al azar, permite “saltar barreras energéticas” permitiendo llegar a mínimos de energía globales <sup>98</sup>. Otro de los algoritmos de tipo estocástico son los Algoritmos Genéticos (AG). La aplicación AG, es una estrategia heurística para la búsqueda de soluciones a un problema u optimización de una técnica y surge originalmente del principio darwiniano de la evolución a través de la selección natural y genética, de ahí su nombre. El AG opera tomando una población de “cromosomas artificiales”. Cada cromosoma representa una solución a un problema y se ajusta a un número real, que es una medida de que tan buena es la solución del problema particular. Comenzando con un conjunto de soluciones generadas al azar se lleva a cabo un proceso iterativo de ajuste basada en la selección y recombinación para producir una población sucesora, la generación próxima. Durante la re-combinación, los cromosomas padres son

seleccionados y su material genético es recombinado para producir cromosomas “hijos”. En este proceso un AG “evoluciona” hacia la mejor solución de un problema dado <sup>99,100</sup>.

### Scoring: funciones de score

Como segunda etapa para una correcta evaluación y ranking de afinidades se aplica una función de *score*. La función de *score* es un elemento fundamental para discriminar entre poses correctas e incorrectas evaluando una serie de propiedades como las interacciones intermoleculares, solvatación, interacciones electrostáticas y efectos entrópicos entre otros. En esta etapa, se determinan los valores de energía de interacción, que caracterizan a la misma, como el  $\Delta G$  de unión (energía libre de Gibbs) y las constantes de afinidad  $k_a$  (constante de unión). Existen tres tipos de función de *score*, las basadas en campo de fuerza, las empíricas y las basadas en conocimiento <sup>96,97,101</sup>.

Las funciones de *score* basadas en campos de fuerza, se basan en la descomposición de la energía de unión del ligando en varios términos individuales: la energía debida a interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas, energías de unión/torsión/estiramiento de enlaces, etc., aplicando para eso un conjunto de parámetros derivados de distintos campos de fuerza. Usualmente, se utilizan campos de fuerza como AMBER o CHARMM. Programas como AUTODOCK <sup>102</sup>, utilizan este tipo de función de *score*. Uno de los mayores desafíos de estas funciones es como incorporan al cálculo el efecto del disolvente. Algunos campos de fuerza, incluyen un término entrópico, disminuyendo este problema. Entre ellos, ciertos campos de fuerza tratan a las moléculas de agua explícitamente, lo cual es bastante costoso computacionalmente. A su vez, existen otros métodos que tratan a las moléculas de agua como un medio dieléctrico continuo. Estos últimos, son más accesibles computacionalmente. El modelo de Poisson-Boltzmann/área superficial (PB/SA) y el modelo generalizado de Born/área superficial (GB/SA) utilizan estos modelos implícitos<sup>103</sup>.

Las funciones de *score* empíricas, están diseñadas para reproducir valores experimentales. Se basan en la idea que la energía de unión ( $\Delta G$ ) puede ser

aproximada aplicando una suma de términos parametrizados individuales no correlacionados ( $\Delta G_i$ ) (Ecuación 4). El cálculo se realiza sumando varios términos como energías de van der Waals, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, efecto del disolvente, hidrofobicidad, etc. Estos datos, son obtenidos mediante regresiones lineales usando valores determinados experimentalmente. Glide <sup>104</sup> y Chem Score <sup>97</sup>, son algunas de estas funciones.

$$\Delta G = \sum_i W_i \cdot \Delta G_i$$

Ecuación 4

Estas funciones de *score*, son computacionalmente más eficientes que las basadas en campo de fuerza, pero dependen de la disponibilidad de datos experimentales de complejos ligando-proteína adecuados a la situación.

Finalmente, las funciones de *score* basadas en conocimiento, buscan reproducir las estructuras experimentales. Para ello, estas funciones, utilizan complejos proteína-ligando conocidos, y son modeladas, usando potenciales relativos a la interacción de pares atómicos. Matemáticamente, estas funciones calculan el potencial de cada interacción de un par atómico aplicando para ello la ecuación de potencial de Boltzmann invertida, y finalmente los suman para obtener la energía total. Comparada con las anteriores esta función de *score* posee un buen equilibrio entre eficiencia y costo computacional, aunque su desventaja es que la misma se limita a ciertos conjuntos de proteína-ligando no pudiendo ser aplicada en muchos casos <sup>101,105</sup>.

#### **1.1.6.4. Dinámica Molecular y Docking aplicados al estudio de interacciones proteína carbohidrato.**

Como se mencionó previamente, la variedad en la estructura de los glicanos, no está dada solo por los múltiples monómeros posibles, sino también las posibles conformaciones espaciales que cada uno puede adquirir. Asimismo, la naturaleza del glicano también estará determinada por los enlaces entre los monómeros y la orientación espacial que adopten los mismos debido a los ángulos de torsión de los enlaces, y de los enlaces de hidrógeno intramoleculares entre hidroxilos cercanos del glicano.

Los azúcares cíclicos presentan naturaleza anfipática, ya que su estructura cuenta con múltiples grupos hidroxilos polares, y “parches” hidrofóbicos dados por los carbonos e hidrógenos alifáticos del anillo <sup>106-108</sup>. Los hidroxilos polares, serán muy importantes en la especificidad de la interacción mediante la generación de enlaces de hidrógeno con ciertos grupos polares de la cadena lateral de la proteína. Por su parte las interacciones hidrofóbicas, aportarán estabilidad a dicha interacción, “anclando” el ligando a la proteína. La contribución energética de estas interacciones a la energía de unión es bastante elevada (Figura 1.18).

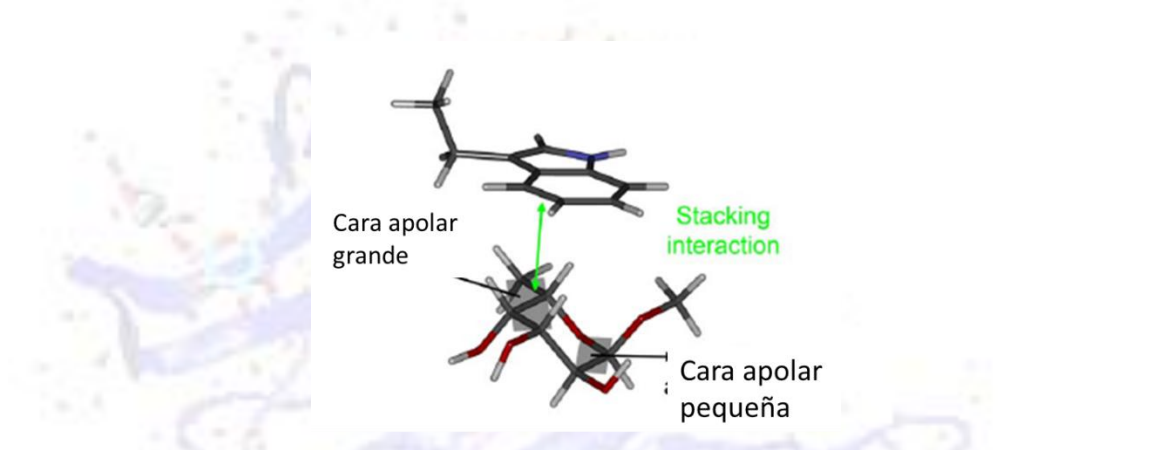


Figura 1.18. Interacción apolar proteína-carbohidrato (Adaptado de Wimmerova et al 2012 <sup>108</sup>).

La mayoría de los carbonos de los monosacáridos son centros estereogénicos y están unidos a un grupo hidroxilo. A su vez cada uno de esos grupos hidroxilos es capaz de formar enlaces glicosídicos con otro monosacárido. La conformación de un glicano se define por los ángulos de torsión entre los monosacáridos que lo constituyen:  $\phi$  y  $\psi$  (Figura 1.2). El ángulo de torsión  $\omega$ , correspondiente a la rotación del enlace C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>, aporta grados de libertad.

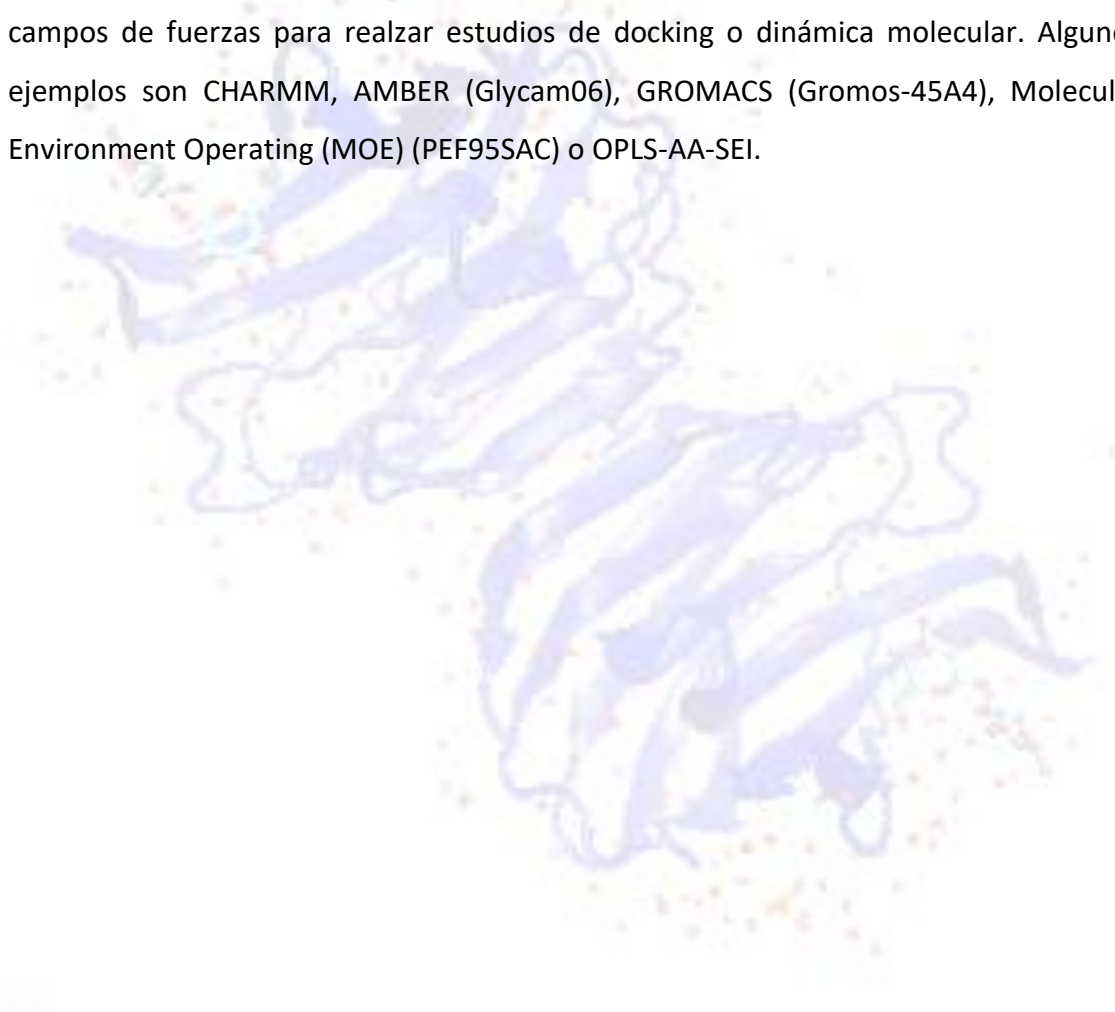
No menos importante es que la secuencia O-C-C-O, (O<sub>5</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-O<sub>6</sub>) omnipresente en carbohidratos, aporta efectos estereoelectrónicos al monosacárido cíclico que difieren de los ciclohexanos típicos <sup>106,109</sup>.

Dada la complejidad estructural de los carbohidratos resulta evidente la necesidad de contar con herramientas computacionales que tengan en cuenta todas sus variables estructurales.

Existen numerosos campos de fuerza, aplicados a proteínas, sin embargo, son más limitados los aplicables a exclusivamente a carbohidratos.

El desarrollo de campos de fuerzas aplicables a carbohidratos posee desafíos adicionales porque se debe tener en cuenta la flexibilidad inherente a los glicanos, el hecho de que los mismos en muchas ocasiones se encuentran ramificados, y tienen múltiples posibilidades de formar enlaces de hidrógeno intramoleculares <sup>106,107</sup>.

Teniendo en cuenta esas consideraciones, algunos grupos de investigación han logrado desarrollar campos de fuerza que representan mejor estas características. Algunos de los campos de fuerza más utilizados para azúcares son CHARMM <sup>88,110</sup>, GLYCAM06 <sup>92</sup>, GROMOS-45A4 <sup>89</sup>, PEF95SAC <sup>111</sup> y OPLS-AA-SEI <sup>112</sup>. Distintos programas utilizan estos campos de fuerzas para realizar estudios de docking o dinámica molecular. Algunos ejemplos son CHARMM, AMBER (Glycam06), GROMACS (Gromos-45A4), Molecular Environment Operating (MOE) (PEF95SAC) o OPLS-AA-SEI.



## 1.2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de doctorado fue establecer una estrategia que permitiera el diseño racional de inhibidores de galectinas con potencial actividad antitumoral. Para ello se propone por un lado el uso de herramientas computacionales para predecir el comportamiento de los ligandos seleccionados con las galectinas, y por otro lado se propone la síntesis enzimática de dichos compuestos y la evaluación de su actividad biológica.

Para cumplir con el mismo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

### 1) Síntesis enzimática de los galactocompuestos (Capítulo 3)

Tomando como modelo los glicanos naturales que se unen a las galectinas, al igual que referencias bibliográficas en relación a estructuras de galactosidos con potencial afinidad por las galectinas, se propuso la síntesis enzimática de una serie de galactocompuestos. Se planteó el uso del sistema de transglicosilación catalizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, utilizando lactosa u ONPG como dadores de grupo galactosilo y lactosa, celobiosa, *N,N'*-diacetil-D-quitobiosa y alcohol bencílico como aceptores, con el objetivo de obtener galactocompuestos con estructuras del tipo:

- ✓  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosido
- ✓  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosido
- ✓  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-N-acetilglucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-N-acetilglucopiranosido.
- ✓ bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

### 2) Diseño de un modelo teórico de interacción galectina-carbohidrato (Capítulo 4)

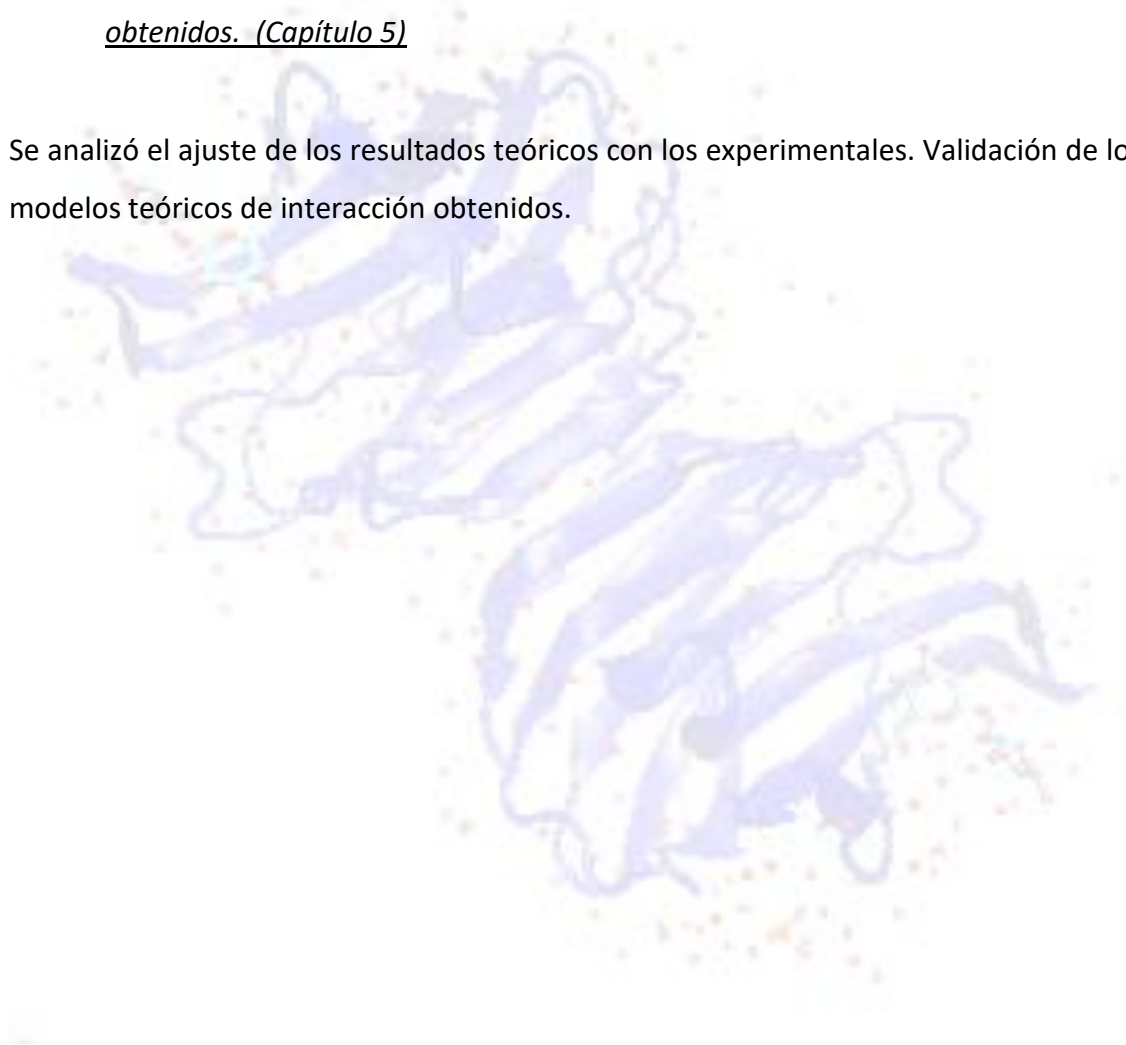
Se propuso un estudio detallado *in silico* de la interacción entre los galactooligosacáridos y galactósidos sintetizados como potenciales inhibidores y las galectinas 1 y 3 humanas (hGal-1 y hGal-3 respectivamente) mediante estudios de dinámica y docking molecular, utilizando distintos programas computacionales disponibles.

3) *Evaluación biológica in vitro de los galactocompuestos sintetizados (Capítulo 5)*

Se evaluó la actividad biológica de los compuestos sintetizados enzimáticamente junto con otros de referencia, mediante estudios de ensayos de inhibición en fase sólida de galectinas 1 y 3 humana, y estudios de interacción entre galectina 1 humana mediante Titulación por Calorimetría Isotérmica.

4) *Validación de los modelos teóricos de interacción galectina-carbohidrato obtenidos. (Capítulo 5)*

Se analizó el ajuste de los resultados teóricos con los experimentales. Validación de los modelos teóricos de interacción obtenidos.



### 1.3. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ajit, V.; Sharon, N. *Essentials Glycobiol.* **2009**, 1–21.
- (2) Ghazarian, H.; Idoni, B.; Oppenheimer, Steven, B. *Acta Histochem.* **2011**, *113* (3), 236–247.
- (3) Muchnik de Lederkremer, R.; Varela, O. *Hidratos de carbono*; Secretaría General de la Organización de Estados Americanos: Washington DC, 1988.
- (4) Lacetera, A.; Berbís, A.; Nurisso, A.; Jimenez-Barbero, J.; Martín-Santamaría, S. In *Computational Tools for Chemical Biology*; 2018; pp 145–162.
- (5) Grindley, T. B. *Structure and Conformation of Carbohydrates*; 2008.
- (6) Grant, O. C.; Smith, H. M. K.; Firsova, D.; Fadda, E.; Woods, R. J. *Glycobiology* **2014**, *24* (1), 17–25.
- (7) Kumari, M.; Sunoj, R. B.; Balaji, P. V. *Carbohydr. Res.* **2012**, *361*, 133–140.
- (8) Sharon, N.; Lis, H. *Science (80- )*. **1989**, *246* (4927), 227–234.
- (9) Spiro, R. G. *Glycobiology* **2002**, *12* (4), 43–56.
- (10) Gorelik, E.; Galili, U.; Raz, A. *Cancer Metastasis Rev.* **2001**, *20* (3–4), 245–277.
- (11) Brockhausen, I.; Stanley, P. In *Essentials of Glycobiology [Internet]*.; 2017; pp 1–12.
- (12) Stanley, P.; Taniguchi, N.; Aebi, M. In *Essentials of Glycobiology [Internet]*.; 2017; pp 1–12.
- (13) Sharon, N.; Lis, H. *Glycobiology* **2004**, *14* (11), 53–62.
- (14) Taylor, M. E.; Drickamer, K.; Schnaar, R. L.; Etzler, M. E.; Varki, A. In *Essentials of Glycobiology [Internet]*.; Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., E., Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2017; pp 1–12.
- (15) Gabius, H. J.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Romero, A.; Solís, D. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36* (6), 298–313.
- (16) Cagnoni, A. J.; Pérez Sáez, J. M.; Rabinovich, G. A.; Mariño, K. V. *Front. Oncol.* **2016**.
- (17) Barondes, S. H.; Castronovo, V.; Cooper, D. N. W.; Cummings, R. D.; Drickamer, K.; Felzi, T.; Gitt, M. A.; Hirabayashi, J.; Hughes, R. C.; Kasai, K. I.; Leffler, H.; Liu, F.-T.; Lotan, R.; Mercurio, A. M.; Monsigny, M.; Pillal, S.; Poirer, F.; Raz, A.; Rigby, P. W. J.; Rini, J. M.; Wang, J. L. *Cell* **1994**, *76*, 597–598.
- (18) Cummings, R. D.; Liu, F.; Vasta, G. R. In *Essentials of Glycobiology [Internet]*.; 2017; pp 1–12.
- (19) Rabinovich, G. a.; Cumashi, A.; Bianco, G. a.; Ciavardelli, D.; Iurisci, I.; D'Egidio, M.; Piccolo, E.; Tinari, N.; Nifantiev, N.; Iacobelli, S. *Glycobiology* **2006**, *16* (3), 210–220.
- (20) Rabinovich, G. A.; Croci, D. O. *Immunity* **2012**, *36* (3), 322–335.
- (21) Yang, R.-Y. Y.; Rabinovich, G. A.; Liu, F.-T. T. *Expert Rev. Mol. Med.* **2008**, *10* (17), 1–24.



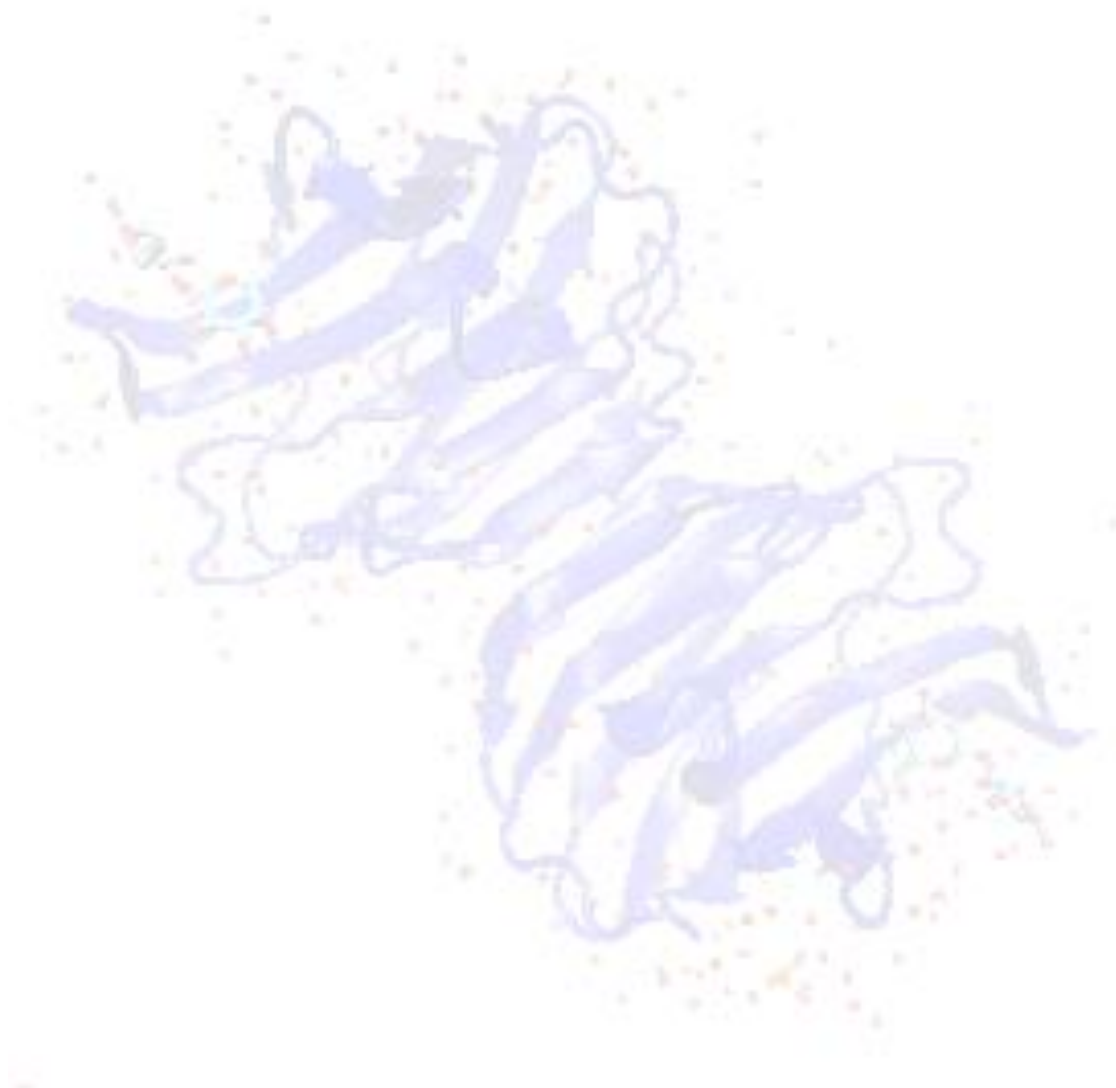
- (22) Elola, M. T.; Chiesa, M. E.; Alberti, A. F.; Mordoh, J.; Fink, N. E. *J. Biomed. Sci.* **2005**, *12* (1), 13–29.
- (23) Chan, Y. C.; Lin, H. Y.; Tu, Z.; Kuo, Y. H.; Hsu, S. T. D.; Lin, C. H. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (2), 1–20.
- (24) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242.
- (25) Meynier, C.; Guerlesquin, F.; Roche, P. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2009**, *27* (1), 49–57.
- (26) Hasan, S. S.; Ashraf, G. M.; Banu, N. *Cancer Lett.* **2007**, *253* (1), 25–33.
- (27) Ito, K.; Stannard, K.; Gabutero, E.; Clark, A. M.; Neo, S. Y.; Onturk, S.; Blanchard, H.; Ralph, S. J. *Cancer Metastasis Rev.* **2012**, *31* (3–4), 763–778.
- (28) López-Lucendo, M. F.; Solís, D.; André, S.; Hirabayashi, J.; Kasai, K. I.; Kaltner, H.; Gabius, H. J.; Romero, A. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343* (4), 957–970.
- (29) Nesmelova, I. V.; Ermakova, E.; Daragan, V. a.; Pang, M.; Menéndez, M.; Lagartera, L.; Solís, D.; Baum, L. G.; Mayo, K. H. *J. Mol. Biol.* **2010**, *397* (5), 1209–1230.
- (30) Camby, I.; Le Mercier, M.; Lefranc, F.; Kiss, R. *Glycobiology* **2006**, *16* (11).
- (31) Di Lella, S.; Sundblad, V.; Cerliani, J. P.; Guardia, C. M.; Estrin, D. A.; Vasta, G. R.; Rabinovich, G. A. *Biochemistry* **2011**, *50* (37), 7842–7857.
- (32) Di Lella, S.; Martí, M. A.; Álvarez, R. M. S.; Estrin, D. A.; Díaz Ricci, J. C. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (25), 52–56.
- (33) Salomonsson, E.; Larumbe, A.; Tejler, J.; Tullberg, E.; Rydberg, H.; Sundin, A.; Khabut, A.; Frejd, T.; Lobsanov, Y. D.; Rini, J. M.; Nilsson, U. J.; Leffler, H. *Biochemistry* **2010**, *49* (44), 9518–9532.
- (34) Meynier, C.; Feracci, M.; Espeli, M.; Chaspoul, F.; Gallice, P.; Schiff, C.; Guerlesquin, F.; Roche, P. *Biophys. J.* **2009**, *97* (12), 3168–3177.
- (35) Téllez-Sanz, R.; García-Fuentes, L.; Vargas-Berenguel, A. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (24), 2979–2990.
- (36) Seetharaman, J.; Kanigsberg, A.; Slaaby, R.; Leffler, H.; Barondes, S. H.; Rini, J. M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (21), 13047–13052.
- (37) Fortuna-Costa, A.; Gomes, A. M.; Kozlowski, E. O.; Stelling, M. P.; Pavão, M. S. G. *Front. Oncol.* **2014**, *4* (June), 1–9.
- (38) Rabinovich, G. A.; Toscano, M. A. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9* (5), 338–352.
- (39) Oberg, C. T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Glycochemistry Today* **2011**, *65* (1), 1–5.
- (40) Bhavaniprasad, V.; Anbarasu, K.; Jayanthi, S. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2014**, *9* (3), 428–436.
- (41) Kuwabara, I.; Sano, H.; Liu, F. T. *Methods Enzymol.* **2003**, *363* (1999), 532–552.
- (42) Ingrassia, L.; Camby, I.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Nshimyumukiza, P.; Darro, F.; Kiss, R.

- Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (29), 3513–3527.
- (43) Rabinovich, G. a.; Baum, L. G.; Tinari, N.; Paganelli, R.; Natoli, C.; Liu, F. T.; Iacobelli, S. *Trends Immunol.* **2002**, *23* (6), 313–320.
- (44) Yang, R.-Y.; Rabinovich, G. A.; Liu, F.-T. *Expert Rev. Mol. Med.* **2008**, 1–24.
- (45) Astorgues-Xerri, L.; Riveiro, M. E.; Tijeras-Raballand, A.; Serova, M.; Neuzillet, C.; Albert, S.; Raymond, E.; Faivre, S. *Cancer Treat. Rev.* **2014**, *40* (2), 307–319.
- (46) Marchiori, M. F.; Riul, T. B.; Oliveira Bortot, L.; Andrade, P.; Junqueira, G. G.; Foca, G.; Doti, N.; Ruvo, M.; Dias-Baruffi, M.; Carvalho, I.; Campo, V. L. *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25* (21), 6049–6059.
- (47) Giguère, D.; Bonin, M. A.; Cloutier, P.; Patnam, R.; St-Pierre, C.; Sato, S.; Roy, R. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16* (16), 7811–7823.
- (48) Sundblad, V.; Mathieu, V.; Kiss, R.; Rabinovich, G. a. *Galectins*, Second Edi.; Elsevier, 2013.
- (49) Ledeen, R. W.; Kopitz, J.; Abad-Rodríguez, J.; Gabius, H. J. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2018**, *156*, 289–324.
- (50) Klyosov, A. A. *Galectins and Disease Implications for Targeted Therapeutics*; Klyosov, A. A., Traber, P. G., Eds.; ACS SYMPOSIUM SERIES 1115: Washington DC, 2012.
- (51) Cummings, R. D.; Liu, F. *Essentials Glycobiol. 2nd Ed.* **2009**, 1–12.
- (52) Takasaki, S.; Yamashita, K.; Suzuki, K. *J. Biochem.* **1980**, *88*, 1587–1594.
- (53) Jin, F.; Chammass, R.; Engel, J.; Reinhold, V. *Glycobiology* **1995**, No. Gm 45701, 157–158.
- (54) Patnaik, S. K.; Potvin, B.; Carlsson, S.; Sturm, D.; Leffler, H.; Stanley, P. *Glycobiology* **2006**, *16* (4), 305–317.
- (55) Salameh, B. A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (14), 3344–3346.
- (56) Tejler, J.; Nilsson, U. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2343–2345.
- (57) Cumpstey, I.; Carlsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1922–1932.
- (58) Fort, S.; Kim, H. S.; Hindsgaul, O. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (19), 7146–7154.
- (59) Peterson, K.; Collins, P. M.; Huang, X.; Kahl-Knutsson, B.; Essén, S.; Zetterberg, F. R.; Oredsson, S.; Leffler, H.; Blanchard, H.; Nilsson, U. J. *RSC Adv.* **2018**.
- (60) Campo, V. L.; Marchiori, M. F.; Rodrigues, L. C.; Dias-Baruffi, M. *Glycoconj. J.* **2016**, *33* (6), 853–876.
- (61) Rajput, V. K.; MacKinnon, A.; Mandal, S.; Collins, P.; Blanchard, H.; Leffler, H.; Sethi, T.; Schambye, H.; Mukhopadhyay, B.; Nilsson, U. J. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (17), 8141–8147.
- (62) Cagnoni, A. J.; Kovensky, J.; Uhrig, M. L. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (14), 6456–6467.

- (63) Collins, P. M.; Öberg, C. T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J.; Blanchard, H. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79* (3), 339–346.
- (64) Dings, R. P. M. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *1*, 1–22.
- (65) Salameh, B. A.; Cumpstey, I.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18* (14), 5367–5378.
- (66) Tejler, J.; Tullberg, E.; Nilsson, U. J. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1353–1362.
- (67) Šimonová, A.; Kupper, C. E.; Böcker, S.; Müller, A.; Hofbauerová, K.; Pelantová, H.; Elling, L.; Křen, V.; Bojarová, P. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *101*, 47–55.
- (68) Ichikawa, Y.; Look, G. C.; Wong, C.-H. *Anal. Biochem.* **1992**, *202*, 215–238.
- (69) Bojarová, P.; Kren, V. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27* (4), 199–209.
- (70) Daines, A. M.; Maltman, B. A.; Flitsch, S. L. **2004**, 106–113.
- (71) Porciuncula González, C.; Giacomini, C.; Irazoqui, G. In *Beta-galactosidase: Properties, structure and functions*; Eloy Kras, Ed.; Nova Science Publishers, Inc: New York, 2019; pp 65–115.
- (72) Maksimainen, M. M.; Lampio, A.; Mertanen, M.; Turunen, O.; Rouvinen, J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *60*, 109–115.
- (73) Binder, W.; Kahlig, H.; Schmid, W. *Tetrahedron* **1994**, *50* (35), 10407–10418.
- (74) Binder, W. H.; Kiihlig, H.; Sehm, W. *Tetrahedron* **1995**, *6* (7), 1703–1710.
- (75) Park, Y. K.; De Santi, M. S. S.; Pastore, G. M. *J. Food Sci.* **1979**, *44* (1), 101–103.
- (76) López, R.; Fernández-Mayoralas, A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (4), 737–745.
- (77) Stevenson, D. E.; Stanley, R. A.; Furneaux, R. H. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42* (5), 657–666.
- (78) Van Rantwijk, F.; Woudenberg-Van Oosterom, M.; Sheldon, R. a. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **1999**, *6* (6), 511–532.
- (79) Tejler, J.; Skogman, F.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342* (12–13), 1869–1875.
- (80) Laaf, D.; Bojarová, P.; Elling, L.; Vladimír, K. *Trends Biotechnol.* **2018**, 1–14.
- (81) Vidal, P.; Roldós, V.; Fernández-Alonso, M. D. C.; Vauzeilles, B.; Bleriot, Y.; Cañada, F. J.; André, S.; Gabius, H. J.; Jiménez-Barbero, J.; Espinosa, J. F.; Martín-Santamaría, S. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (43), 14581–14590.
- (82) Echeverria, I.; Mario Amzel, L. *Biophys. J.* **2011**, *100* (9), 2283–2292.
- (83) Walker, A. R.; Bonomi, R.; Popov, V.; Gelovani, J. G.; Andrés Cisneros, G. *J. Mol. Graph. Model.* **2017**, *71*, 211–217.
- (84) Ceroni, A.; Dell, A.; Haslam, S. M. *Source Code Biol. Med.* **2007**, *2*, 1–13.
- (85) Guha, R. *Encycl. Ref. Mol. Pharmacol.* **2006**, No. 9915607, 370–370.

- (86) Asensio, J. L.; Jimenez-Barbero, J. *Biopolymers* **1995**, *35* (1), 55–73.
- (87) Salomon-Ferrer, R.; Case, D. A.; Walker, R. C. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2013**, *3* (2), 198–210.
- (88) Guvench, O.; Hatcher, E. R.; Venable, R. M.; Pastor, R. W.; MacKerell, Jr., A. D. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5* (9), 2353–2370.
- (89) Lins, R. D.; Hünenberger, P. H. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (13), 1400–1412.
- (90) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-rives, J. **1996**, *7863* (15), 11225–11236.
- (91) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Comput. Chem.* **2004**, *56531*, 1157–1174.
- (92) Kirschner, K.; Yongye, A.; Tschampel, S.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2015**, *29* (4), 622–655.
- (93) Sousa, S. F.; Ribeiro, a J. M.; Coimbra, J. T. S.; Neves, R. P. P.; Martins, S. a; Moorthy, N. S. H. N.; Fernandes, P. a; Ramos, M. J. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (18), 2296–2314.
- (94) Ou-Yang, S. S.; Lu, J. Y.; Kong, X. Q.; Liang, Z. J.; Luo, C.; Jiang, H. *Acta Pharmacol. Sin.* **2012**, *33* (9), 1131–1140.
- (95) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935–949.
- (96) Huang, S. Y.; Zou, X. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11* (8), 3016–3034.
- (97) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *65*, 15–26.
- (98) Yuriev, E.; Agostino, M.; Ramsland, P. a. *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24* (2), 149–164.
- (99) McCall, J. J. *Comput. Appl. Math.* **2005**, *184* (1), 205–222.
- (100) Vankudoth, R.; Shireesha, P.; Devi, T. R. *Int. J. Adv. Res.* **2016**, *6* (9), 301–306.
- (101) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935–949.
- (102) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.;Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, *30* (16), 2785–2791.
- (103) Wojciechowski, M.; Lesyng, B. *J. Phys. Chem. B* **2004**, No. 3, 18368–18376.
- (104) Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 534–553.
- (105) Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 337–356.
- (106) Fadda, E.; Woods, R. J. *Drug Discov. Today* **2014**, *15* (0), 596–609.
- (107) Woods, R. J.; Tessier, M. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 575–583.
- (108) Wimmerova, M.; Kozmon, S.; Necasova, I.; Mishra, S. K.; Komárek, J.; Koca, J. *PLoS One* **2012**, *7* (10), 1–9.

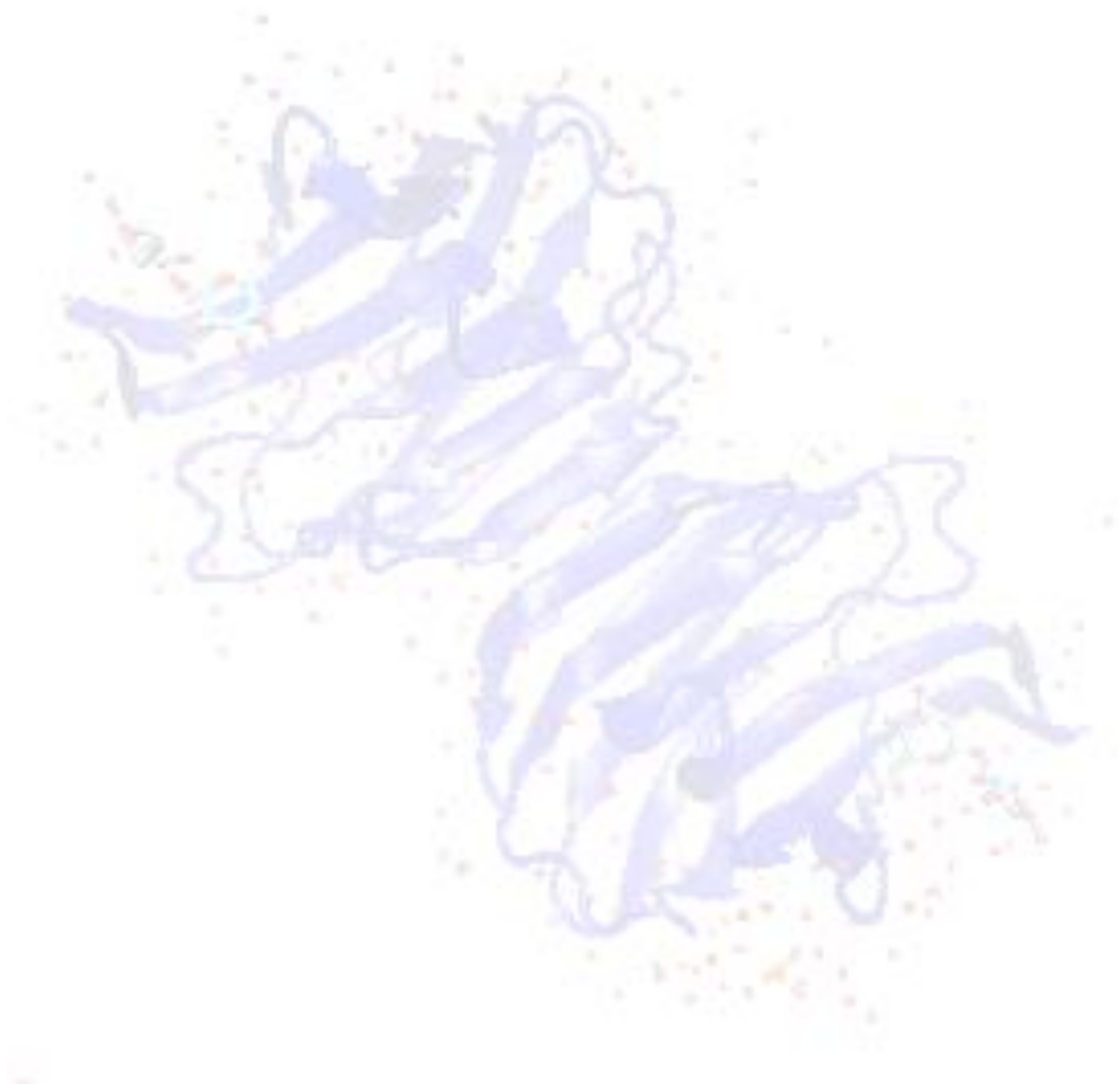
- (109) Vidal, P.; Vauzeilles, B.; Blériot, Y.; Sollogoub, M.; Sinaÿ, P.; Jiménez-Barbero, J.; Espinosa, J. F. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342* (12–13), 1910–1917.
- (110) Guvench, O.; Greenr, S. N.; Kamath, G.; Brady, J. W.; Venable, R. M.; Pastor, R. W.; Mackerell, A. D. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (15), 2543–2564.
- (111) Fabricius, J.; Engelsen, S. B.; Rasmussen, K. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16* (6), 751–772.
- (112) Kony, D.; Damm, W.; Stoll, S.; Van Gunsteren, W. F. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23* (15), 1416–1429.





# **CAPÍTULO 2:**

## **Materiales y Métodos**



## 2.1 MATERIALES

### 2.1.1. Proteínas

La galectina-1 humana recombinante (hGal-1) fue producida previamente de acuerdo a lo reportado por Pace et al. 2003 <sup>1</sup>. La galectina-3 humana recombinante (hGal-3), así como los anticuerpos específicos biotinilados y la peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada a estreptavidina fueron adquiridas en ABCAM (Cambridge, Reino Unido). La enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -D-galactosida galactohidrolasa; EC 3.2.1.23) de *Aspergillus oryzae*, fue adquirida en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El extracto enzimático Cytolase PCL5 fue adquirido en Ferrari S.R.L. (Verona, Italia).

### 2.1.2. Reactivos

Los reactivos *O*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido (4-MUG), lactosa, celobiosa, galactosa, glucosa, dopamina, tirosina y orcinol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las placas de TLC fueron compradas a Machery Nagel (Duren, Germany). Las columnas PD-10 (Sephadex G-25) y el gel Sephadex G-10, fueron adquiridos a GE Health Care (Buckinghamshire, UK). *N,N'*-diacetilquitobiosa, *N*-acetil-D-lactosamina, lacto-*N*-biosa, alolactosa y *N*-acetilalolactosamina fueron adquiridos en Carbosynth (Berkshire, UK). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### 2.1.3. Programas

MOE (Molecular Operating Environment) versión 2011.10; Schrödinger 2015.V2; AUTODOCK 4.2; AUTOGRID4.2 Autodock Tools; VMD (Visual Molecular Dynamics).

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Preparación del extracto de enzima $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*

Se realizó una suspensión de enzima a partir de 2.0 g de enzima en 15 mL de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.5 (buffer de actividad) con agitación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante conteniendo la enzima se almacenó a 4°C.



### **2.2.2. Determinación de la concentración de proteínas**

La determinación de concentración de proteínas se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA) <sup>2</sup>.

### **2.2.3. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa**

Se incubaron 100  $\mu$ L de una dilución adecuada de enzima con 2.0 mL de ONPG 25 mM en buffer de actividad a temperatura ambiente. La velocidad de formación de *o*-nitrofenol (ONP) se determinó espectrofotométricamente a 405 nm utilizando un coeficiente de extinción de  $0.75 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a pH 5.5.

Se definió la unidad de enzima como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de ONP por minuto a pH 5.5 y temperatura ambiente. La actividad enzimática se expresó como UE/mL.

### **2.2.4. Evaluación de la actividad $\beta$ -glucosidasa en el extracto de la enzima $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae***

#### **2.2.4.1. Electroforesis "en espejo".**

Se gel filtró el extracto de  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* en columnas PD-10 (Sephadex G25) en buffer de actividad y se diluyó hasta una concentración de 2 mg/mL. A continuación se le realizaron a la muestra dos tratamientos: i) se mezclaron dos volúmenes de muestra con un volumen de buffer de muestra (0.92 g de dodecilsulfato de sodio (SDS), 4 g de glicerol, 0.3 g de TRIS,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v) y 2 mL de una solución 0.1 % de azul de bromofenol en 20 mL de agua, ajustado a pH 6.8) y se calentó a 100°C durante 5 minutos; ii) se mezclaron dos volúmenes de muestra con un volumen de buffer de muestra (0.92 g de dodecilsulfato de sodio (SDS), 4 g de glicerol, 0.3 g de TRIS y 2 mL de una solución 0.1 % de azul de bromofenol en 20 mL de agua, ajustado a pH 6.8) (preparación de muestra en condiciones no reductoras para zimograma).

Se sembraron 15  $\mu$ L por pocillo de  $\beta$ -galactosidasa y de un extracto enzimático citolasa PCL5 con actividad  $\beta$ -glucosidasa que se utilizó como control positivo en un gel homogéneo de poliacrilamida 7% de entrecruzamiento. Se sembraron en la primera

sección del gel las muestras preparadas en condiciones reductoras y luego en los otros dos tercios del gel las preparadas en condiciones no reductoras (se sembraron por duplicado). La SDS-PAGE se realizó de acuerdo a los procedimientos estándar en un equipo BIORAD Modelo Mini-Protean II <sup>3,4</sup>. Una vez finalizada la corrida, se dividió el gel en tres partes, conteniendo en la primera parte las muestras preparadas en condiciones reductoras y en las otras dos las sembradas en condiciones no reductoras y se revelaron mediante técnicas diferentes.

#### Revelado con Coomassie

La porción del gel conteniendo las muestras preparadas en condiciones desnaturizantes reductoras se reveló mediante el método Coomassie <sup>5</sup>.

#### Zimograma

Previo al revelado enzimático específico, se realizó la renaturalización de las proteínas. Para ello las otras dos partes del gel (conteniendo la muestra tratada en condiciones no reductoras) se incubaron en una solución de Tritón X100 1.5% v/v durante una hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavaron con agua destilada hasta verificar ausencia de espuma.

#### Revelado con ONPG

Se sumergió una de las dos partes del gel donde se sembraron las enzimas tratadas en condiciones no reductoras, en una solución de ONPG 25 mM en buffer de actividad y se incubó a 37°C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se inspeccionó visualmente la presencia de bandas de color amarillo indicativas de actividad  $\beta$ -galactosidasa. La enzima hidroliza el ONPG liberando *o*-nitrofenol que absorbe a 405 nm por lo que es de color amarillo.

#### Revelado con MUG

Se sumergió la tercera parte del gel donde se sembraron las enzimas tratadas en condiciones no reductoras en una solución de 4-MUG 25 mM en buffer fosfato de sodio pH 7.0 y se incubó a 37°C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se inspeccionó mediante lámpara UV presencia de bandas que absorben en el UV,

indicativas de actividad  $\beta$ -glucosidasa. La enzima hidroliza el metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido liberando la metilumbilferona que absorbe en la región ultravioleta.

#### **2.2.4.2. Purificación del extracto de $\beta$ -galactosidasa mediante cromatografía de exclusión molecular del extracto.**

La cromatografía de exclusión molecular se realizó utilizando equipo ÄKTA purifier equipado con una columna Superdex G-200 (10/300) acoplado a un detector de tipo UV. La fase móvil utilizada fue buffer de actividad a un flujo de 0.25 mL/min. Se recolectaron fracciones de 0.5 mL y se evaluó de manera cualitativa actividad  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa en cada una de ellas. Para ello en una placa de 96 pocillos de fondo plano se mezclaron 50  $\mu$ L de cada fracción y 50  $\mu$ L de 4-MUG o ONPG, respectivamente. La actividad se analizó por inspección visual para ONPG o mediante lámpara de luz UV en caso de 4-MUG.

#### **2.2.5. Síntesis de los trisacáridos y galactósidos**

La síntesis enzimática se llevó a cabo utilizando lactosa u ONPG como dadores de grupo galactosilo y diferentes aceptores (lactosa, celobiosa, *N,N'*-diacetilquitobiosa, alcohol bencílico) en presencia de  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (1 -6 UE/mL). La mezcla de reacción fue incubada a diferentes temperaturas dependiendo del dador seleccionado (25°C y 50°C) durante 24 horas. A continuación, se describen los detalles para cada síntesis.

##### **2.2.5.1. Síntesis de $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosido (Compuesto 2).**

Una mezcla conteniendo lactosa (100 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (6 UE/mL) en buffer de actividad fue incubada a 50 °C durante 24 horas. Se tomaron alícuotas a intervalos regulares de tiempo y la reacción se detuvo por calentamiento a 100 °C por 5 minutos. Las muestras fueron analizadas por cromatografía en capa fina (TLC) (sección 2.2.6.1). El compuesto **2** se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando ÄKTA Purifier (GE Healthcare) como se describe en la sección 2.2.6.3.1. El rendimiento de la reacción se calculó como el cociente entre la cantidad de compuesto

2 liofilizado puro (mg) y la máxima cantidad de compuesto esperado, expresado como porcentaje. Se alcanzaría un máximo rendimiento de síntesis si toda la galactosa proveniente del 50% de las moléculas de lactosa se transfiriera al otro 50% de moléculas de lactosa debido a que la lactosa funciona tanto como dador y aceptor de galactosa.

**2.2.5.2- Síntesis de  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosido (compuestos 3 y 4).**

Una mezcla conteniendo celobiosa (100-300 mM), ONPG (50 mM) y enzima  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) en buffer de actividad fue incubada a temperatura ambiente durante 24 horas. Se tomaron alícuotas a intervalos regulares de tiempo y la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 5 minutos. Las muestras fueron analizadas por TLC (sección 2.2.6.1). La mezcla de isómeros (compuestos 3+4) se purificó por TLC preparativa como se describe en la sección 2.2.6.3.2. El rendimiento de reacción se expresó como el cociente entre la cantidad de compuesto (3+4) liofilizado puro (mg) y la cantidad máxima de compuesto esperada (mg) expresada como porcentaje. La máxima cantidad esperada se calcula como la cantidad de compuesto generada (mg) si todos los residuos de galactosa de la molécula de ONPG fueran transferidos a moléculas de celobiosa.

**2.2.5.3. Síntesis de  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-N-acetilglucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-N-acetilglucopiranosido (compuesto 6).**

Una mezcla conteniendo *N,N'*-diacetilquitobiosa (200 mM), ONPG (50 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) en buffer de actividad, fue incubada a 25° C durante 24 horas. Se tomaron alícuotas a intervalos regulares de tiempo y la reacción se detuvo por calentamiento a 100 °C por 5 minutos. Las muestras fueron analizadas por TLC (sección 2.2.6.1). El compuesto 6 se purificó por TLC preparativa como se describe en la sección 2.2.6.3.2. El rendimiento de reacción se expresó como el cociente entre la cantidad de compuesto 6 liofilizado puro (mg) y la cantidad máxima de compuesto esperada (mg) expresada como porcentaje. La máxima cantidad esperada se calcula como la cantidad de compuesto generada (mg) si todos los

residuos de galactosa provenientes de la molécula de ONPG fueran transferidos a las moléculas de *N,N'*-diacetilquitobiosa.

#### **2.2.5.4 Síntesis control**

Se realizaron los siguientes controles: i) una mezcla conteniendo ONPG (50 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) en buffer de actividad; ii) una mezcla conteniendo celobiosa (200 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) en buffer de actividad; iii) una mezcla conteniendo diacetilquitobiosa (200 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) en buffer de actividad. En todos los casos se incubaron a 25 °C durante 24 horas bajo agitación suave. Se sacaron alícuotas a intervalos regulares de tiempo y se detuvo la reacción enzimática por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras fueron analizadas por TLC (sección 2.2.6.1). El compuesto sintetizado en la reacción control (ii) (Compuesto **11**) se purificó por cromatografía de exclusión molecular como se describe en la sección 2.2.6.3.1.

#### **2.2.5.5. Síntesis de bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido (compuesto 5).**

Una mezcla conteniendo lactosa (120 mM), alcohol bencílico (240 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (3 UE/mL) en buffer de actividad fue incubada a 50°C durante 24 horas bajo agitación suave. Se tomaron alícuotas a intervalos regulares de tiempo y la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C por 5 minutos. Las muestras fueron analizadas por TLC (sección 2.2.6.1). El compuesto **5** se purificó por TLC preparativa como se describe en la sección 2.2.6.3.2. El rendimiento de síntesis se calculó como el cociente entre la cantidad de compuesto **5** liofilizado puro (mg) y la máxima cantidad de compuesto esperada expresada como porcentaje. La máxima cantidad esperada se calcula como la cantidad de compuesto generada (mg) si toda la galactosa de las moléculas de lactosa se transfiriera al alcohol bencílico.

## **2.2.6 Métodos generales de análisis, identificación y purificación.**

### **2.2.6.1 Análisis por TLC analítica**

Se sembraron 5  $\mu$ L de las muestras o los estándares correspondiente en placas de TLC de Sílica Gel 60 de 0.25 mm y se desarrolló en el siguiente sistema de disolventes: metanol: cloroformo: acetona: hidróxido de amonio (42:16:25:16). Se revelaron hisopando la placa con orcinol 2% (p/v) en una mezcla etanol:ácido sulfúrico (95:5, v/v) (revelador específico para carbohidratos) y luego se aplicó calor con secador a 160 °C. Para la detección de grupo nitro se realizó un revelado específico utilizando una combinación dos soluciones. Primero se hisopó la placa con cloruro estañoso 0.15% en una mezcla de ácido clorhídrico y agua (7.5:90, v/v). Posteriormente se aplicó 2,6-dimetilbenzaldehído 0.5% (m/v) en una mezcla de etanol, ácido clorhídrico y 1-butanol (15:1.5:90, v/v). En esta tesis nos referiremos a este revelador como revelador específico para grupos nitro.

### **2.2.6.2. Análisis por HPLC analítico**

Se realizó el seguimiento de la reacción de síntesis mediante HPLC utilizando un equipo Waters, equipado con detectores de índice de refracción y ultravioleta. Se utilizó una columna Shodex Asahiapak NH<sub>2</sub>P50 4E, 4.6 mm d.i. x 250 mm de largo. La elución se realizó en condiciones isocráticas, con acetonitrilo: agua (75:25, v/v) a un flujo de 1 mL/min a 25°C.

### **2.2.6.3. Purificación de los glicósidos**

#### **2.2.6.3.1 Cromatografía de exclusión molecular**

Se utilizó un equipo de ÄKTA purifier equipado con una columna preparativa de Sephadex G10 (26 mm d.i. x 900 mm) acoplado a un detector índice de refracción. Se eluyó en forma isocrática con agua Milli-Q a un flujo de 0.10 mL/min (0.13 cm/h). Se hizo un pool con las fracciones correspondientes a cada pico, se liofilizaron, se verificó pureza por TLC y HPLC y se identificaron por RMN.

#### 2.2.6.3.2. TLC preparativa

Se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción en placas de Sílica Gel 60 de 0.25 mm y se desarrollaron en el sistema de disolventes metanol:cloroformo:acetona:hidróxido de amonio (42:16:25:16). A los efectos de identificar el área de la placa conteniendo el compuesto de interés, los bordes de la placa se revelaron con orcinol 2%. Se raspó la sílica de la zona correspondiente al compuesto de interés y el mismo se extrajo por sonicación en una mezcla de metanol: agua (20:80 v/v). La suspensión se centrifugó 10 min a 8700 g. El procedimiento de extracción se realizó tres veces consecutivas, se juntaron los sobrenadantes y se evaporó el disolvente en evaporador rotatorio a vacío (SpeedVac modelo SPD1010). Por último se liofilizaron las muestras (liofilizador Labotec LGJ-12) y se verificó pureza por TLC analítica.

#### **2.2.6.4. Identificación de los compuestos**

La identificación de los compuestos sintetizados y purificados se realizó mediante resonancia magnética nuclear. Dichos estudios fueron realizados en el Centro Universitario de Paysandú (CUP) por la Dra. Carolina Fontana.

Los espectros de RMN fueron registrados en solución de  $\text{D}_2\text{O}$  (~0.55 mL) a 25° C en un espectrómetro Bruker Avance III 500 MHz equipado con una sonda de 5mm Z-gradiente TXI (1He13C/15N). Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  se reportan en ppm usando una señal residual de HDO como referencia ( $\delta_{\text{H}}$  4.77) <sup>6</sup>. Los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  también en ppm usando como referencia los datos simulados por CASPER <sup>7,8</sup>.

#### **2.2.7. Estudios computacionales**

##### **2.2.7.1. Preparación de las proteínas**

Las estructuras cristalizadas de hGal-1 y 3 fueron obtenidas de la base de datos Protein Data Bank (hGal-1 pDBs ID: 1GWZ, 4Q26; hGal-3 pDBID: 3ZSJ, 1A3K). Las estructuras fueron protonadas utilizando la herramienta Protonate3D. Se corrigieron las

estructuras y fueron minimizadas utilizando el campo de fuerzas AMBER99 en el software Molecular Operating Environment versión 2011.10 (MOE 2011.10).

### **2.2.7.2. Preparación de los ligandos**

#### 2.2.7.2.1. Construcción de los ligandos en el programa MOE

Los carbohidratos fueron generados aplicando la herramienta Carbohydrate Builder. Posteriormente se minimizó su energía utilizando el campo de fuerza PEF95SAC con un gradiente de 0.001 kcal/mol.

#### 2.2.7.2.2. Construcción de los ligandos en GLYCAM

En este caso los ligandos fueron creados a través de la herramienta Carbohydrate Builder de la plataforma GLYCAM (glycam.org). Los ligandos se obtuvieron en conformaciones de mínima energía y para ello se utilizó el campo de fuerza Glycam06.

### **2.2.7.3. Dinámica Molecular de las proteínas y ligandos**

Se utilizaron dos programas diferentes: MOE 2011.10<sup>9</sup> y GROMACS<sup>10</sup>.

Las simulaciones de dinámica molecular realizadas con MOE se llevaron a cabo utilizando las estructuras de las proteínas con y sin ligando coordinado, se realizó una simulación a 300 K durante 10 ns, usando el campo de fuerzas AMBER99 y en caja de agua, y condiciones periódicas. Para la simulación en Gromacs se produjo una trayectoria de 200 ns, empleando el campo de fuerzas AMBERff99sb y solvatación explícita. A partir de la simulación se realizó un análisis de cluster, tomando los últimos 50 ns de la trayectoria de dinámica molecular obtenida con Gromacs seleccionando un cut-off de 0.15 Å.

Las estructuras de los ligandos también fueron estabilizadas mediante Dinámica Molecular, previa etapa de minimización en MOE. Dicho procesamiento se realizó usando el algoritmo NPA (Nose-Poincare-Andresen) y un campo de fuerzas PEF95SAC<sup>11</sup>. La dinámica se llevó a cabo por 500 ps a 300 °K.



#### **2.2.7.4. Docking Molecular**

##### 2.2.7.4.1. Docking Molecular con AUTODOCK 4.2

Las estructuras para el experimento de docking se prepararon en el programa Autodock Tools. A los átomos de los ligandos se les asignó cargas de tipo Gasteiger, mientras que a la proteína cargas Kollmann. Se generó una grilla en AUTOGRID4, de 46 x 40 x 50 centrada en el Trp68 para galectina-1 y de 46 x 46 x 46 centrada en el Trp181 para galectina-3 con un espacio de grilla de 0.375 Å.

El docking se llevó a cabo usando el algoritmo genético lamarckiano (*Lamarckian Genetic Algorithm*) del programa AUTODOCK4.2<sup>12</sup>. Para cada cálculo se realizaron 100 corridas (docking runs) usando una población de 150 individuos y  $2.5 \times 10^6$  evaluaciones de energía.

##### 2.2.7.4.2. Docking Molecular Schrödinger 2015 Versión 3

Se llevaron a cabo experimentos de docking molecular aplicando el método de Ajuste Inducido (IFD) disponible en Schrödinger 2015 V3, empleando la interface gráfica Maestro V 10.2; New York, 2015). Todos los sistemas (ligandos y galectinas) fueron preparados en Maestro. Los ligandos fueron preparados considerando únicamente el esteroisómero natural de cada carbohidrato. Los estados de protonación fueron asignados de acuerdo al pKa y considerando pH 7.0.

La estructura de las proteínas fue refinada mediante una minimización de energía usando el campo de fuerzas de mecánica molecular OPLS2005 con un gradiente de 0.1 kcal/mol Å, empleando la herramienta *Protein preparation wizard* de Maestro.

Este experimento consta de tres etapas que se realizan en Maestro: i) el experimento de IFD en sí mismo (usando Glide), ii) el refinamiento posterior de las poses obtenidas (usando Prime), iii) redocking (usando GlideXP)

El experimento inicial de IFD se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en Sherman 2006 et al<sup>13,14</sup>. El docking se realizó utilizando el algoritmo Grid-Based Ligand Docking with Energetics (Glide). Se generó una grilla centrada en el ligando co-cristalizado con cada receptor, en particular en el enlace *O*-glicosídico.

Solo se conservaron aquellas poses más representativas (con diferencia de energías menores a 2.5 kcal/mol con respecto a la de menor energía obtenida, máximo 20 poses). Posteriormente se realizó un refinamiento utilizando Prime para minimizar la energía del ligando y de los aminoácidos que se encuentran en un radio de 5.0 Å alrededor de las poses.

Finalmente, la etapa de re-docking se realizó utilizando el algoritmo Extra Precision Grid-Based Ligand Docking with Energetics (Glide XP).

#### ***2.2.7.5 Estimación de la energía libre de unión del complejo ligando-galectina***

Las mejores poses obtenidas en ambos métodos de docking fueron seleccionadas para este experimento utilizando el programa MOE. Se minimizó la energía del complejo utilizando la herramienta LigX provista por dicho programa, con un gradiente RMS de 0.01 kcal/mol Å. Los átomos del ligando y los del receptor más cercanos al mismo (menos de 8 Å) fueron flexibles, mientras que el resto del receptor se mantuvo fijo. Finalmente, la afinidad del complejo se estimó usando la función de score GBVI/WSA dG, obteniéndose la energía en kcal/mol.

#### **2.2.8. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos.**

Estos experimentos se llevaron a cabo en el marco de dos pasantías en el Laboratorio Glicómica Funcional y Molecular del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, Buenos Aires, Argentina.

##### ***2.2.8.1. Ensayo en fase sólida de inhibición de la unión de la galectina a la glicoproteína asialofetuina (ASF) por los ligandos sintetizados (SPA)***

El ensayo de fase sólida se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Rapoport et al. 2010<sup>15</sup> con modificaciones. Se adsorbió una solución de asialofetuina (ASF) (10 µg/mL en buffer NaHCO<sub>3</sub>, pH = 9.6) en una placa de 96 pocillos de fondo plano y se incubó toda la noche a 4°C. Se lavó la placa tres veces con buffer fosfato salino (PBS) suplementado con Tween 20 0.05% (v/v) y se bloquearon las interacciones inespecíficas por incubación con seroalbúmina bovina (BSA) 2% p/v en PBS. Al finalizar el bloqueo se lavó con PBS.

En paralelo se pre-incubaron los inhibidores a evaluar (en concentraciones de 0.2 a 8.0 mM en PBS conteniendo 0.3% BSA) con hGal-1(60 µg/mL) o hGal-3 (40 µg/mL) a 37 °C durante 2 h.

Finalmente, alícuotas de 50 µL de esta solución conteniendo la galectina y el potencial ligando fueron agregados en los pocillos con ASF inmovilizada. Se incubó la placa a 37 °C durante 2 h y luego se lavó con PBS-Tween 0.05%. Para la detección de lectina unida se incubó durante 1h a temperatura ambiente con anticuerpos  $\alpha$ hGal-1 o  $\alpha$ hGal-3 biotinilados (0.2 µg/ml) en PBS-Tween 0.05%. Luego se eliminó el exceso de anticuerpo por lavado con PBS-Tween 0.05% y se incubó con estreptavidina-peroxidasa (HRP) (0.3 µg/ml en PBS-BSA 0.3%) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se repitió la etapa de lavado y se detectó la unión de galectina con tetrametilbenzidina (TMB) diluida 1/10000 y peróxido de hidrogeno 30%(v/v) en buffer citrato-fosfato (pH 5.5). La reacción colorimétrica se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se midió absorbancia a 450nm y 550 nm.

#### **2.2.8.2- Calorimetría de titulación isotérmica**

Para las titulaciones se utilizó un equipo Nano-ITC (TA Instruments). Cada titulación implicó como mínimo 20 inyecciones a intervalos de 3 minutos, de alícuotas de 2.5 µL de solución de ligando (2.5 mM) en la celda de muestra (200µL) conteniendo hGal-1 (50 µM). El ligando se disolvió en buffer PBS 20 a 298 K. La celda de titulación se agitó en forma continua a 300 rpm/min.

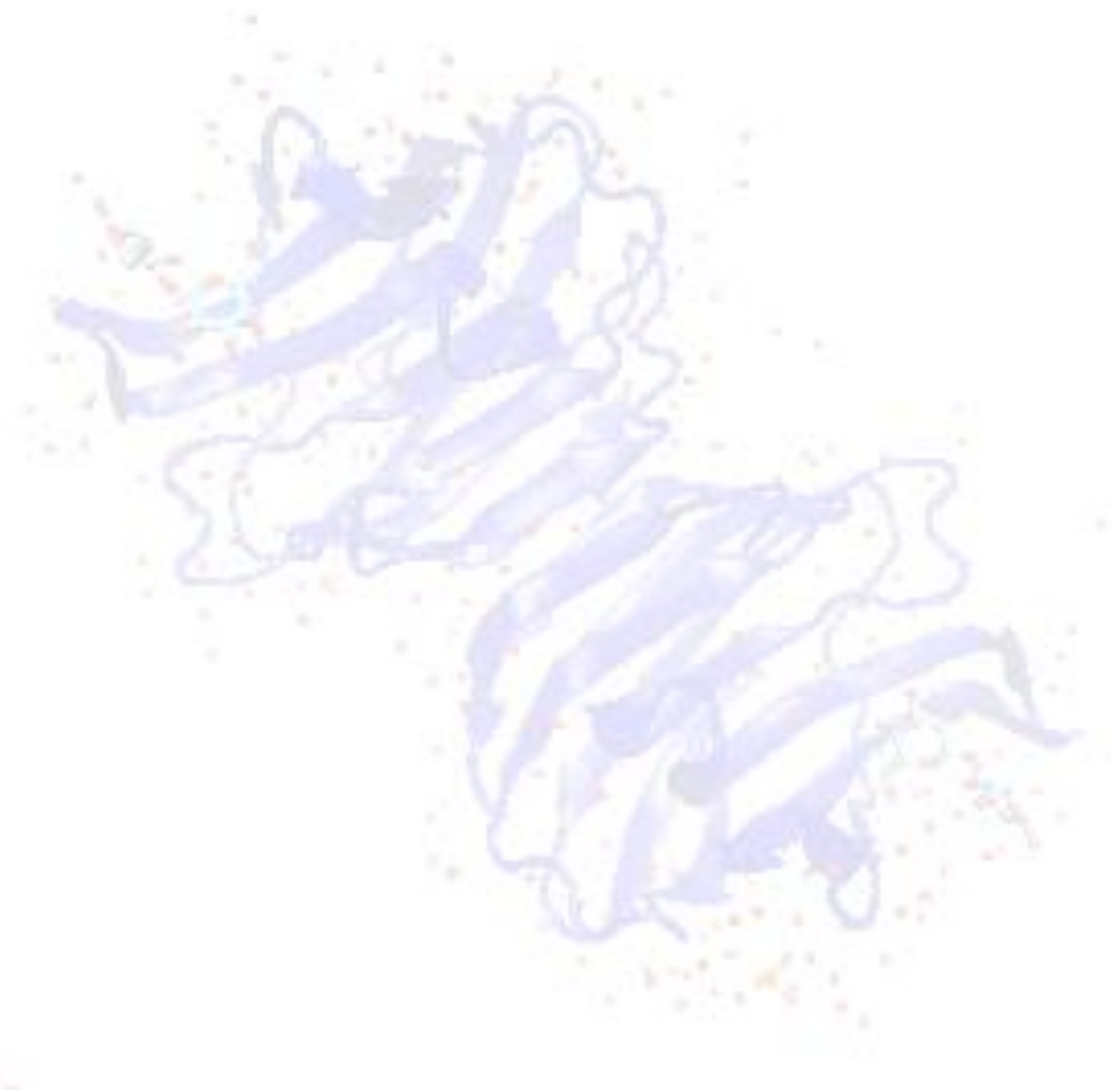
### 2.3. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Pace, K. E.; Hahn, H. P.; Baum, L. G. *Methods Enzymol.* **2003**, *363* (2001), 499–518.
- (2) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Goeke, N. M.; Fujimoto, E. K.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **1985**, *85*, 76–85.
- (3) BIORAD. *Mini- PROTEAN Tetra Cell*.
- (4) Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685.
- (5) Serra, S.; Morgante, L. *Bolletino della Soc. Ital. di Biol. Sper.* **1970**, *56* (2), 160–165.
- (6) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. J. *Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7512–7515.
- (7) Jansson, P.-E.; Kenne, L.; Wildman, G. *Carbohydr. Res.* **1989**, *188*, 169–191.
- (8) Widmalm, G. *Carbohydr. Res.* **2013**, *378*, 123–132.
- (9) Molecular Operating Environment, M. 2011.
- (10) James, M.; Murtola, T.; Schulz, R.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. *Softw. X* **2015**, *1*, 19–25.
- (11) Fabricius, J.; Engelsen, S. B.; Rasmussen, K. J. *Carbohydr. Chem.* **1997**, *16* (6), 751–772.
- (12) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, *30* (16), 2785–2791.
- (13) Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 534–553.
- (14) Sherman, W.; Beard, H. S.; Farid, R. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 83–84.
- (15) Rapoport, E. M.; Pochechueva, T. V.; Kurmyshkina, O. V.; Pazynina, G. V.; Severov, V. V.; Gordeeva, E. A.; Belyanchikov, I. M.; André, S.; Gabius, H.-J.; Bovin, N. V. *Biochemistry. (Mosc)*. **2010**, *75* (3), 310–319.



## **CAPÍTULO 3:**

# **Síntesis enzimática de galactocompuestos**



### 3.1. INTRODUCCIÓN

El interés en la química de carbohidratos ha aumentado notoriamente en las últimas décadas, y obedece entre otras razones al gran desarrollo de la glicobiología. Oligo- y polisacáridos participan en múltiples procesos biológicos entre los que se pueden destacar la migración intracelular y secreción de glicoproteínas, interacciones célula-célula, oncogénesis al igual que interacciones entre células y patógenos <sup>1,2</sup>. En las plantas, los carbohidratos forman parte tanto del metabolismo primario como secundario. Aquellos que participan en el metabolismo secundario cumplen un rol importante en la defensa de las mismas contra microorganismos, insectos y otros organismos patógenos <sup>3</sup>. Dentro de la gran diversidad de carbohidratos de interés biológico se encuentran los glicósidos. Estos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ha demostrado que poseen propiedades antimicrobianas, cardioprotectoras, antiinflamatorias y antitumorales, entre otras <sup>3,4</sup>. Sin embargo, su purificación es una tarea compleja y los rendimientos obtenidos son muy bajos debido a la baja concentración de los glicósidos en la muestra de partida <sup>1</sup>. Su obtención mediante procedimientos de síntesis ha sido una solución ampliamente utilizada, la que a su vez ha permitido la generación de glicósidos con diversas aplicaciones.

La mayoría de los glicósidos generados son obtenidos por síntesis química. Esta herramienta involucra numerosos pasos de protección y desprotección de sus grupos hidroxilo para lograr su objetivo <sup>1</sup>.

Las glicosidasas constituyen una excelente alternativa para la síntesis de glicósidos, ya que su estereoselectividad permite la obtención de glicósidos anoméricamente puros en un solo paso de reacción y en condiciones ambientalmente amigables <sup>5-7</sup>. Si bien las glicosidasas en la naturaleza actúan como hidrolasas catalizando la ruptura de enlaces glicosídicos, en condiciones adecuadas pueden actuar como transferasas, transfiriendo una unidad de grupo glicosilo de un compuesto dador (glicósido u oligosacárido) a un nucleófilo que actúa como aceptor <sup>8,9</sup>.

Existen varias glicosidasas capaces de catalizar la síntesis de glicósidos. Una de las más utilizadas para la síntesis enzimática de galactósidos es la  $\beta$ -galactosidasa del hongo *Aspergillus oryzae*. Tal como se describió en el Capítulo 1, esta enzima presenta

excelentes propiedades de transglicosilación, mantiene la configuración del carbono anomérico, es estable en un amplio rango de temperaturas, pH y en presencia de una serie de co-solventes orgánicos; razón por lo cual es ideal para la generación de  $\beta$ -galactósidos<sup>10-14</sup>.

Nuestro grupo de investigación posee vasta experiencia el sistema de transglicosilación catalizado por esta enzima, aplicado a la síntesis de pequeños galactósidos y trisacáridos. Hemos sintetizado enzimáticamente una serie de galactósidos incluyendo el generado durante el desarrollo de mi tesis de maestría<sup>15-19</sup>.

Las galectinas tienen afinidad por  $\beta$ -galactósidos. Dicha afinidad depende no solo de la galactosa que interacciona con el subsitio de C del DRC de la galectina, sino también del residuo adyacente a la galactosa<sup>20,21</sup>. Los ligandos naturales de galectinas son glicanos que contienen estructuras tipo poli-*N*-acetil-lactosamina. Por esta razón nos propusimos sintetizar distintos trisacáridos con residuos de glucosa, galactosa y *N*-acetilglucosamina. Para ello utilizamos como aceptores disacáridos como lactosa, celobiosa y *N,N'*-diacetilquitobiosa con el objetivo de generar los siguientes trisacáridos.

- $\beta$ -D-Galp-(1→X)- $\beta$ -D-Galp-(1→4)-D-Glcp
- $\beta$ -D-Galp-(1→X)- $\beta$ -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp
- $\beta$ -D-Galp-(1→X)- $\beta$ -D-GlcNAcp-(1→4)-D-GlcNAcp

Por otra parte, existen distintos reportes de inhibidores de galectinas, de tipo  $\beta$ -galactósidos con residuos aromáticos en su estructura<sup>22,23</sup>. Por esa razón otro de los objetivos de este capítulo es la síntesis enzimática del galactocompuesto bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido utilizando alcohol bencílico como aceptor.

Dado que la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* retiene la configuración del centro anomérico, los enlaces formados entre los residuos de los galactocompuestos formados tendrán configuración beta.



## 3.2. RESULTADOS

### 3.2.1. Síntesis de trisacáridos

#### 3.2.1.1 Síntesis del compuesto $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosido (compuesto 2)

La síntesis del trisacárido  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (Compuesto 2) se llevó a cabo incubando lactosa ( $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp, Compuesto 1) 100 mM en presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (6 UE/mL) a 50 °C por 24 horas (Figura 3.1). La mezcla reactiva fue analizada mediante cromatografía en capa fina (TLC).

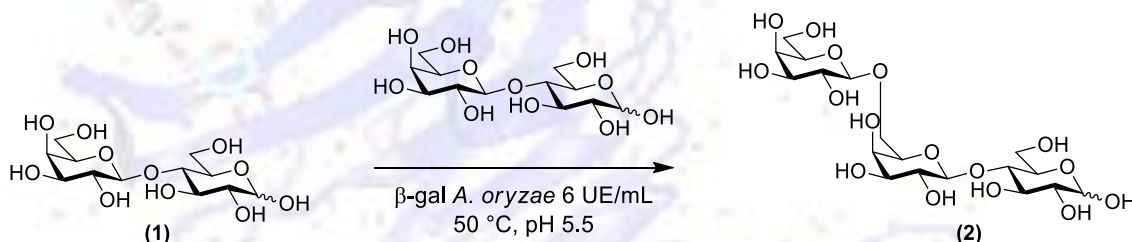


Figura 3.1. Síntesis del compuesto 2

En la Figura 3.2 se muestra el avance de la síntesis enzimática a medida que transcurre la reacción.

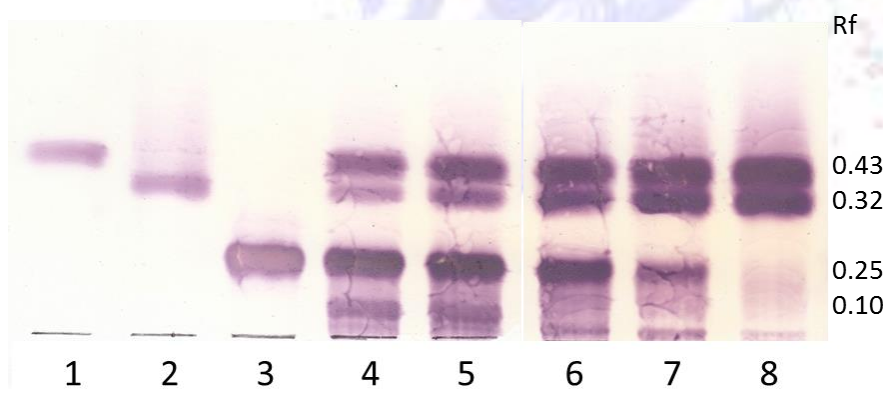
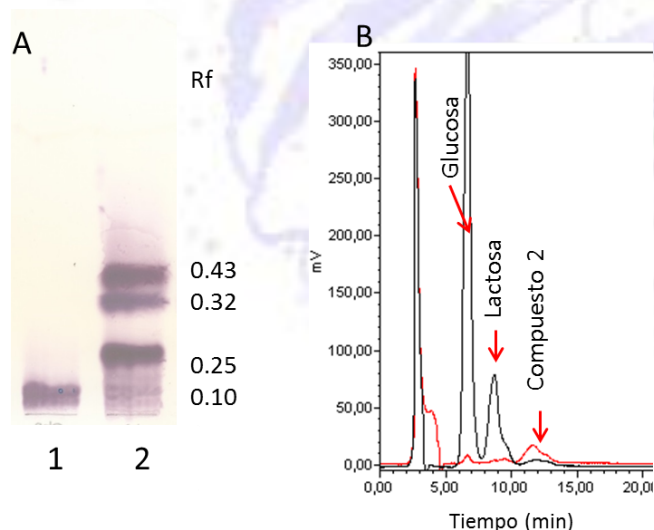


Figura 3.2, Seguimiento por TLC del avance de la reacción de síntesis utilizando lactosa (100 mM) como sustrato dador y aceptor, pH 5.5, 50 °C en presencia de  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* 6 UE/mL: 1- Estándar de glucosa 50 mM; 2- Estándar de Galactosa 50 mM; 3- 0 h de síntesis; 4- 0,5 h; 5- 2 h; 6- 3 h; 7- 6 h; 8- 24 h.

Se observan una disminución en la intensidad las bandas correspondientes a la lactosa ( $R_f$  0.25), así como un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a los productos de hidrólisis, glucosa ( $R_f$  0.43) y galactosa ( $R_f$  0.32). A su vez se observa un nuevo producto con  $R_f$  0.10 que puede ser atribuido al producto de la reacción de transglucosilación (compuesto **2**) en la cual la  $\beta$ -galactosidasa cataliza la transferencia de un residuo de galactosa de una molécula de lactosa a otra.

La presencia de los productos de hidrólisis indica que la reacción de hidrólisis tiene lugar como reacción secundaria. Sin embargo, se observa que el aumento de la concentración de glucosa es mayor que el aumento de la concentración de galactosa, lo que indicaría que no toda la galactosa que se libera por la conversión de la lactosa se libera como galactosa libre y por tanto está siendo transgalactosilada (esquema 1.15). La síntesis del compuesto **2** alcanza un máximo rendimiento al cabo de 2 horas, luego de lo que comienza a disminuir su concentración como consecuencia de su hidrólisis enzimática, hasta que al cabo de 24 horas no se observa compuesto remanente. El compuesto **2** fue purificado a partir de la alícuota de síntesis correspondiente a un tiempo de reacción de 2 horas mediante TLC preparativa, y su pureza determinada por TLC analítica y HPLC (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Análisis de pureza del compuesto **2**: A: TLC analítica: 1- Compuesto **2** purificado; 2- Síntesis enzimática con lactosa 100 mM tiempo 2 hs. B: HPLC: Superposición de dos cromatogramas: síntesis enzimática con lactosa 100 mM tiempo 2 hs (trazo negro) y compuesto puro (trazo rojo)

El componente mayoritario (>80%) fue caracterizado por espectroscopía de RMN.

### 3.2.1.1.1. Identificación del compuesto 2

Los experimentos de RMN y el análisis de los mismos, fueron realizados en colaboración con la Dra. Carolina Fontana del Laboratorio de Espectroscopía y Físicoquímica Orgánica, perteneciente al Departamento de Química del Litoral, Facultad de Química, UdelaR.

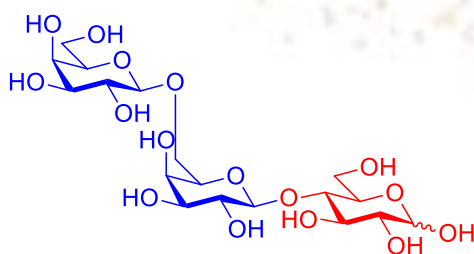
Las asignaciones de las resonancias de los protones  $^1\text{H}$  de cada sistema de spin de los monosacáridos fue llevada a cabo realizando un espectro de  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY con diferentes tiempos de mezcla (20, 40, 60 y 100 ms) y un espectro de  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY con un tiempo de mezcla de 500 ms. Las resonancias del residuo localizado en el extremo reductor del trisacárido (A) fue identificado en ambas formas anoméricas  $\alpha$ - y  $\beta$ -piranosa (residuos  $\text{A}\alpha$  y  $\text{A}\beta$ , respectivamente). La correlación de los patrones en el espectro  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY confirmó que este residuo presenta configuración *gluco* mientras que los residuos B y C tiene configuración *galacto*. Los residuos B y C se encuentran unidos a otro residuo mediante enlace  $\beta$  ya que la constante de acoplamiento  $^3J_{1,2}$  es 7.9 Hz en ambos casos. Las resonancias de  $^{13}\text{C}$  de los residuos de los azúcares fueron asignadas usando un espectro de  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC, y los valores asignados a los desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  se observan en la Tabla 3.1. La posición de las sustituciones en los residuos monosacáridos fue determinada mediante los corrimientos en el espectro de  $^{13}\text{C}$  y la secuencia de los residuos en el trisacárido fue confirmada mediante  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC and  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY. Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC se encuentran en las figuras del Anexo 3 (Figuras A.3.1 y A.3.2) respectivamente. Como consecuencia de todo lo anterior, podemos afirmar que el compuesto **2** es  **$\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranósido** (Figura 3.4).

**Tabla 3.1.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR (ppm) del trisacárido  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (**2**), y correlaciones entre residuos de los espectros de  $^1\text{H}, ^1\text{H-NOESY}$  y  $^1\text{H}, ^{13}\text{C-HMBC}$  spectra. El espectro fue realizado en  $\text{D}_2\text{O}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  en un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz, equipado con una sonda TXI de 5 mm z-gradiente ( $^1\text{H-}^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ).

Residuo		$^1\text{H}/^{13}\text{C}$						Correlación con otro átomo	
		1	2	3	4	5	6	NOE	HMBC
$\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp}$	<b>A<math>\alpha</math></b>	5.21 [3.7]	3.58	3.83	3.65	3.94	~3.86		
		(-0.02)	(0.04)	(0.11)	(0.23)	(0.10)			
		92.54	71.82	72.28	79.99	70.71	60.72		
		(-0.45)	(-0.65)	(-1.50)	(9.28)	(-1.66)	(-1.12)		
$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp}$	<b>A<math>\beta</math></b>	4.66 [8.0]	3.28	3.65	3.65	3.60	3.79, 3.95		
		(0.02)	(0.03)	(0.15)	(0.23)	(0.14)			
		96.44	74.48	75.24	79.99	75.48	60.88		
		(-0.40)	(-0.72)	(-1.52)	(9.28)	(-1.28)	(-0.96)		
$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow$	<b>B</b>	4.45 [7.9]	3.54	3.66	3.96	3.93	3.92, 4.06	H4, A $\alpha/\beta$	C4, A $\alpha/\beta$
		(-0.08)	(0.09)	(0.07)	(0.07)	(0.28)			
		103.84	71.55	73.25	69.20	74.71	69.78		H4, A $\alpha/\beta$
		(6.47)	(-1.41)	(-0.53)	(-0.49)	(-1.22)	(7.94)		
$\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow$	<b>C</b>	4.48 [7.9]	3.54	3.66	3.91	3.70	~3.76	H6a, B; H6b, B	C6, B
		(-0.05)	(0.09)	(0.07)	(0.02)	(0.05)			
		104.08	71.55	73.25	69.32	75.89	61.72		H6a, B; H6b, B
		(6.71)	(-1.41)	(-0.53)	(-0.37)	(-0.04)	(-0.12)		

Los valores de  $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$  se encuentran en Hertz en paréntesis rectangulares. Las diferencias entre los desplazamientos químicos, comparados con los correspondientes monosacáridos, se encuentran en paréntesis curvos<sup>24</sup>.

El rendimiento de reacción para el compuesto **2** purificado fue de 16%, calculado como el porcentaje de mg de trisacárido obtenido relativo a la máxima cantidad esperada, como se describe en el Capítulo 2 (se obtuvieron 10.0 mg del compuesto **2** purificado a partir de 85.5 mg de lactosa, la máxima cantidad esperada para el compuesto **2** era de 63.0 mg). La pureza de mismo fue del 89 % (calculada por HPLC).



**Figura 3.4.** Estructura postulada para el compuesto **2**

### 3.2.1.2. Síntesis del trisacárido $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranososa (compuestos 3 y 4)

Se estudió la síntesis enzimática del compuesto  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranososa, a partir de ONPG (50 mM) como sustrato dador de grupo galactosilo y celobiosa ( $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-Glcp) (100- 300 mM) como aceptor (Figura 3.5).

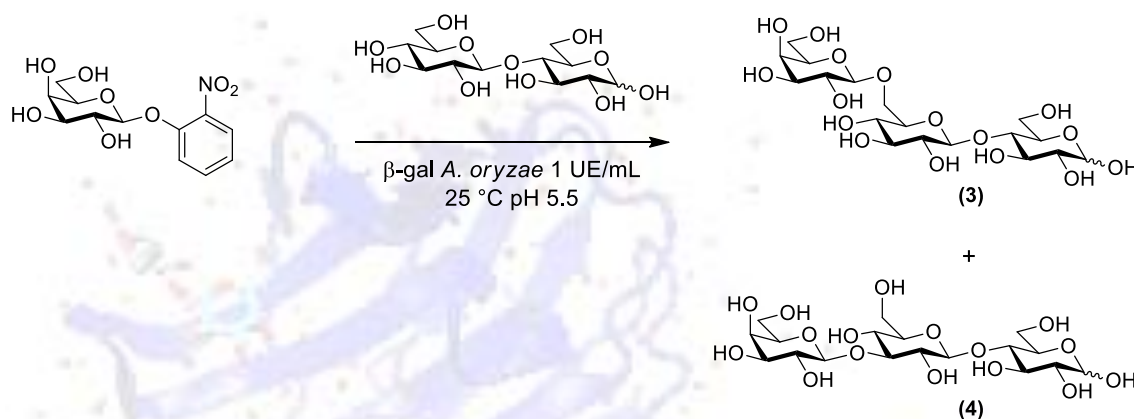


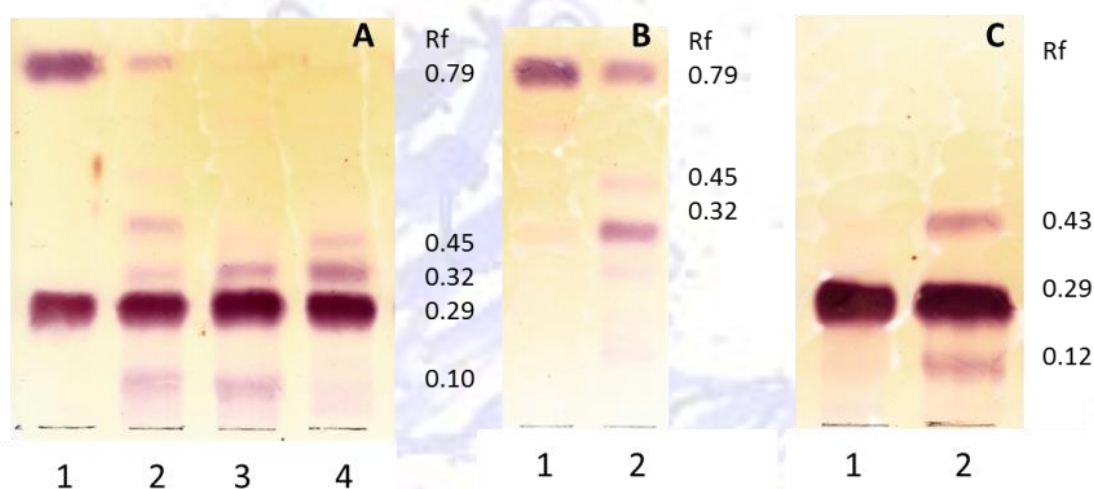
Figura 3.5. Síntesis de los compuestos 3 y 4.

Dicha síntesis se llevó a cabo durante 24 horas, a 25° C y pH 5.5 en presencia de  $\beta$ -galactosidasa (1 UE/mL). El avance de reacción se siguió por TLC (Figura 3.6A).

El ONPG fue seleccionado como dador de grupo galactosilo en lugar de lactosa para evitar la formación en paralelo del compuesto 2 como producto secundario. Se realizaron dos controles de la reacción de síntesis: una incubando el aceptor ONPG con la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en ausencia de celobiosa (Figura 3.6B) y otro, incubando la enzima con celobiosa en ausencia de dador (ONPG) (Figura 3.6C).

La TLC de la figura 3.6A muestra el perfil del avance de la reacción de síntesis enzimática llevada a cabo en presencia de ONPG y celobiosa durante 24 horas. Las bandas con  $R_f$  0.79 y 0.29 corresponden a ONPG y celobiosa respectivamente, mientras que la banda con  $R_f$  0.32 corresponde a galactosa, producto de la hidrólisis enzimática del ONPG. El otro producto de hidrólisis, *o*-nitrofenol (ONP), no es teñido por el revelador orcinol, ya que este último es específico para carbohidratos. Se observan otras dos bandas con  $R_f$  de 0.45 y 0.10 en la TLC; la primera ( $R_f$  0.45) es detectada también en el control de reacción donde la enzima es incubada solo con ONPG (Figura

3.6B). Cuando se revela la TLC con un revelador específico para grupos nitro, sólo las bandas de  $R_f$  0.79 y 0.45 son detectadas, indicando la presencia de dicho grupo funcional en su estructura. La banda de  $R_f$  0.45 probablemente corresponda a productos de transglucosilación en los cuales el ONPG actúa como dador y aceptor a la vez. Las bandas de  $R_f$  0.10 y 0.45 desaparecen a tiempos largos, mientras que la intensidad de la banda correspondiente a galactosa se incrementa, esto puede deberse a la hidrólisis enzimática de dichos compuestos <sup>16,17</sup>.



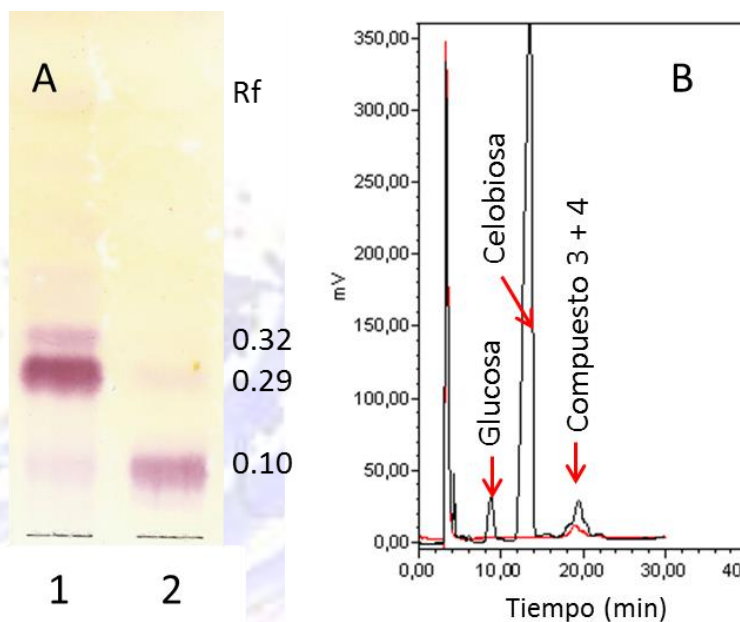
**Figura 3.6.** Avance de la reacción de síntesis mediante TLC: **A:** partiendo de celobiosa (200 mM), ONPG (50 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) a 25 °C y pH 5,5: 1- 0 h; 2- 1 h; 3- 3 h; 4- 24 h; **B:** partiendo de ONPG (50 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) a 25 °C y pH 5,5: 1- 0 h; 2- 1 h; **C:** partiendo de celobiosa (200 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) a 25 °C y pH 5,5: 1- 0h; 2- 2 h.

La síntesis e hidrólisis del compuesto correspondiente a la banda con  $R_f$  0.10 es muy rápida, observándose máxima generación del compuesto a una hora de comenzada la síntesis. Al cabo de 24 horas, solo se observan las bandas correspondientes a galactosa celobiosa y la tenue banda de  $R_f$  0.45.

Dado que el compuesto de  $R_f$  0.10 no se revela con el revelador específico para grupos nitro estaría indicando que el mismo no posee grupos nitro en su estructura. Sumado a esto se observa que no se sintetiza en las condiciones de ninguno de los dos controles. En función de lo anterior se puede inferir que la banda de  $R_f$  0.10 se trataría de un

trisacárido de estructura galactopiranosil- $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ X)-glucopiranosil- $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucopiranosido.

La banda de Rf 0.10 fue purificada por TLC preparativa y su pureza fue verificada por TLC analítica y HPLC (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Análisis de pureza del compuesto de Rf 0.10: **A:** TLC analítica: 1 -Síntesis enzimática con celobiosa 200 mM y ONPG 50 mM a tiempo 1 h; 2- Compuesto con Rf 0.10 purificado; **B:** HPLC: Superposición de los cromatogramas de síntesis enzimática (con celobiosa 200 mM y ONPG 50 mM) a tiempo 1 h (trazo negro) y compuesto puro (trazo rojo)

#### 3.2.1.2.1. Identificación de los compuestos 3 y 4

El material resultante fue caracterizado por espectroscopía de RMN, revelando la presencia de una mezcla de dos trisacáridos (compuestos **3** y **4**).

Las asignaciones de los espectros de resonancias de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de dicha mezcla fueron realizadas de manera análoga a las del compuesto **2** (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR (ppm) de la mezcla de trisacáridos  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**3**) y  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**4**), y correlaciones con otros residuos a partir de los espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY y  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC.

Residuo		$^1\text{H}/^{13}\text{C}$						Correlación con otro átomo (respecto al átomo anomérico)	
		1	2	3	4	5	6	NOE	HMBC
$\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp	<b>3<sub>A<math>\alpha</math></sub></b>	5.21 [3.8]	3.57	3.81	3.63	3.94	~3.86		
		(-0.02)	(0.03)	(0.09)	(0.21)	(0.10)			
		92.69	72.01	72.28	80.34	70.98	60.81		
		(-0.30)	(-0.46)	(-1.50)	(9.63)	(-1.39)	(-1.03)		
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp	<b>3<sub>A<math>\beta</math></sub></b>	4.65 [7.9]	3.27	3.62	3.63	3.59	3.75, 3.95		
		(0.01)	(0.02)	(0.12)	(0.21)	(0.13)			
		96.57	74.76	75.34	80.14	75.56	60.96		
		(-0.27)	(-0.44)	(-1.42)	(9.43)	(-1.20)	(-0.88)		
$\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp(-1 $\rightarrow$	<b>3<sub>B</sub></b>	4.51 [8.0]	3.32	~3.51	3.49	3.66	3.85, 4.23	H4, <b>3<sub>A<math>\beta</math></sub></b>	C4, <b>3<sub>A<math>\beta</math></sub></b>
		(-0.13)	(0.07)	(0.01)	(0.07)	(0.20)			
		103.62	73.93	76.26	70.34	75.70	69.55		H4, <b>3<sub>A<math>\beta</math></sub></b>
		(6.78)	(-1.27)	(-0.50)	(-0.37)	(-1.06)	(7.71)		
$\beta$ -D-Galp(-1 $\rightarrow$	<b>3<sub>C</sub></b>	4.45 [7.9]	3.55	~3.66	3.91	3.69	~3.75	H6a, <b>3<sub>B</sub></b> ; H6b, <b>3<sub>B</sub></b>	C6, <b>3<sub>B</sub></b>
		(-0.08)	(0.10)	(0.07)	(0.02)	(0.04)			
		104.22	71.69	73.52	~69.47	76.03	61.89		H6a, <b>3<sub>B</sub></b> ; H6b, <b>3<sub>B</sub></b>
		(6.85)	(-1.27)	(-0.26)	(-0.22)	(0.10)	(0.05)		
$\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glcp	<b>4<sub>A<math>\alpha</math></sub></b>	5.21 [3.8]	3.57	3.81	3.64	3.94	~3.86		
		(-0.02)	(0.03)	(0.09)	(0.22)	(0.10)			
		92.69	72.01	72.28	79.45	70.86	60.79		
		(-0.30)	(-0.46)	(-1.50)	(8.74)	(-1.51)	(-1.05)		
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp	<b>4<sub>A<math>\beta</math></sub></b>	4.65 [7.9]	3.27	3.62	3.64	3.59	3.75, 3.95		
		(0.01)	(0.02)	(0.12)	(0.22)	(0.13)			
		96.63	74.69	75.17	79.45	75.67	60.92		
		(-0.21)	(-0.51)	(-1.59)	(8.74)	(-1.09)	(-0.92)		
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp(-1 $\rightarrow$	<b>4<sub>B</sub></b>	4.54 [7.9] <sup>a</sup>	3.51	3.77	3.52	~3.51	3.74 , 3.91	H4, <b>4<sub>A<math>\beta</math></sub></b>	C4, <b>4<sub>A<math>\beta</math></sub></b>
		(-0.10)	(0.26)	(0.27)	(0.10)	(0.05)			
		103.18	73.82	84.84	68.97	76.42	61.45		H4, <b>4<sub>A<math>\beta</math></sub></b>
		(6.34)	(-1.38)	(8.08)	(-1.74)	(-0.34)	(-0.39)		
$\beta$ -D-Galp(-1 $\rightarrow$	<b>4<sub>C</sub></b>	4.66 [7.8]	~3.57	3.66	3.91	3.71	~3.75	H3, <b>4<sub>B</sub></b>	C3, <b>4<sub>B</sub></b>
		(0.13)	(0.12)	(0.07)	(0.02)	(0.06)			
		104.16	72.09	73.44	~69.47	76.19	61.95		
		(6.79)	(-0.87)	(-0.34)	(-0.22)	(0.26)	(0.11)		

Los valores de  $^3J_{\text{H1,H2}}$  se encuentran en Hertz en paréntesis rectangulares. Las diferencias entre los desplazamientos químicos, comparados con los correspondientes monosacáridos, se encuentran en paréntesis curvos<sup>24</sup>.

<sup>a</sup> Este desplazamiento químico solo corresponde al residuo **4<sub>B $\beta$</sub>** , ya que el protón anomérico del residuo **4<sub>B $\alpha$</sub>**  puede verse a 4.51 ppm, y se correlaciona con el carbono a 80.66 ppm (C4, **4<sub>A $\alpha$</sub>** ) en el espectro HMBC.

La posición de las sustituciones en los residuos monosacáridos fueron identificados a partir de los corrimientos de glicosilación de  $^{13}\text{C}$ . El residuo B en el compuesto 3 es



→6)-β-D-Glcp-(1→ por un  $\Delta\delta_{C6} = 7.71$  ppm, mientras que el residuo B en el compuesto 4 es →3)-β-D-Glcp-(1→ por un  $\Delta\delta_{C3} = 8.08$  ppm. La secuencia de monosacáridos en los respectivos trisacáridos, fue determinada usando experimentos de  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC y  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY. Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC se encuentran en las figuras del Anexo A.3.3 y A.3.4.

En función de lo anterior el compuesto **3** es β-D-Galp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→4)-D-Glcp y el **4** β-D-Galp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (Figura 3.8). La proporción de ambos compuestos en la mezcla es 65:35 respectivamente.

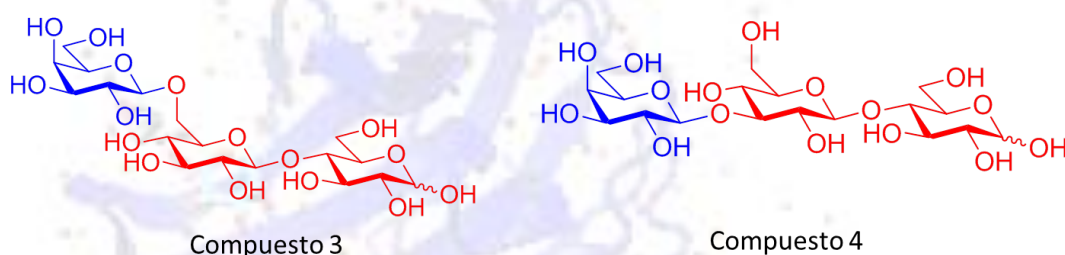


Figura 3.8. Estructuras postuladas para los compuestos 3 y 4.

El rendimiento de reacción de la mezcla de regioisómeros fue de 16 %, expresado como el porcentaje de mg de trisacárido obtenido respecto al máximo de mg de trisacárido esperado si toda las moléculas de galactosa provenientes del ONPG fueran transferidas a la celobiosia (4 mg de la mezcla purificada de los compuestos **3** y **4** fue obtenida a partir de 15 mg de ONPG, siendo 25 mg la máxima cantidad esperada para la mezcla de los compuestos **3** y **4**). La pureza de la mezcla de los compuestos 3 y 4 fue de 98 % (calculada por HPLC).

A pesar de que no se espera reacción enzimática cuando la enzima β-galactosidasa se incubó únicamente con celobiosia, se observan tres bandas en la TLC (Figura 3.6C): una de ellas de  $R_f$  0.29 (que corresponde a celobiosia), otra de  $R_f$  0.43 (correspondiente a glucosa) y una tercera con  $R_f$  de 0.12 (compuesto **11**). Esto puede indicar que o bien la β-galactosidasa de *A. oryzae* es una enzima promiscua que también acepta celobiosia como sustrato, o que el extracto presenta una contaminación con una β-glucosidasa. En ambos casos, un residuo de glucosa es transferido desde una molécula de celobiosia a otra generando un trisacárido con la siguiente estructura β-D-Glcp-(1→X)-β-D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (Figura 3.9); y simultáneamente un residuo de glucosa es liberado. Sin

embargo, no se observa liberación de glucosa cuando la enzima está en presencia de celobiosa y ONPG (Figura 3.6A). Esto evidencia que en las condiciones propuestas para la síntesis de los compuestos **3** y **4** la actividad  $\beta$ -glucosidasa no se ve favorecida.

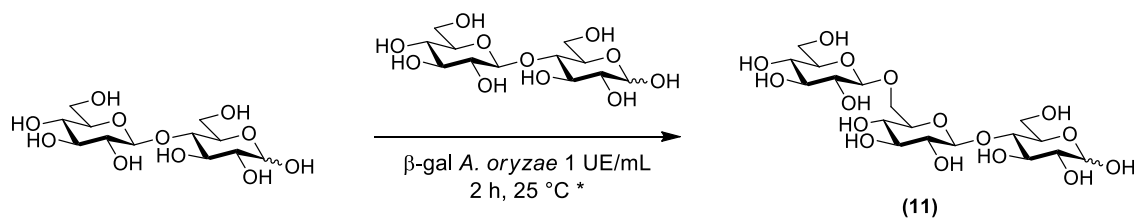


Figura 3.9: Síntesis del compuesto 11.

El compuesto de  $R_f$  0.12 (compuesto **11**) fue purificado por cromatografía de exclusión molecular y su pureza verificada por TLC analítica (Figura 3.10). El compuesto fue obtenido con un grado de pureza de 91 % (calculada por HPLC).

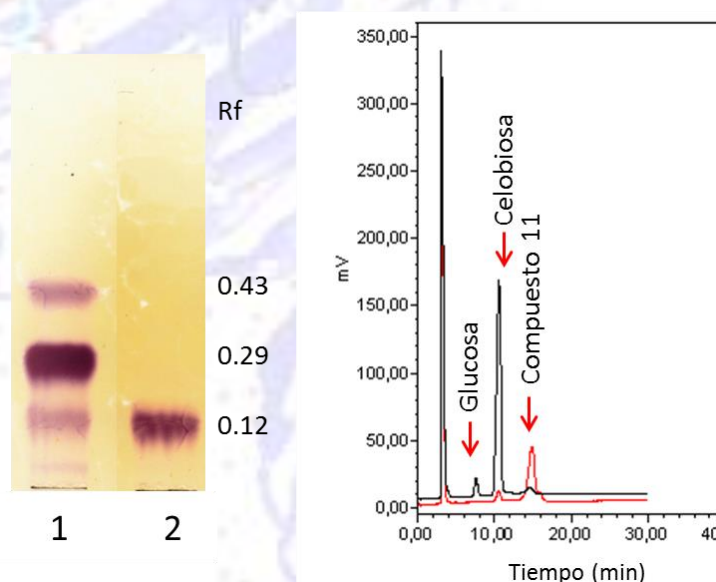


Figura 3.10. Análisis de pureza del compuesto de  $R_f$  0.12: **A:** TLC analítica: 1 - Síntesis enzimática con celobiosa 200 mM y ONPG 50 mM a 24 h ; 2- Compuesto de  $R_f$  0.12 purificado; **B:** HPLC: Superposición de los cromatogramas de síntesis enzimática (con celobiosa 200 mM y ONPG 50 mM) a 24 h (trazo negro) y compuesto puro (trazo rojo)

### 3.2.1.2.2. Identificación del compuesto 11

El compuesto purificado fue identificado por RMN y el programa CASPER<sup>25</sup>. Las asignaciones de los desplazamientos se resumen en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR (ppm) del trisacárido  $\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$ , y sus correlaciones con otros residuos obtenidos del espectro  $^1\text{H}, ^1\text{H-NOESY}$ .

Residuo	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$						Correlación con otro átomo (respecto al átomo anomérico)	
	1	2	3	4	5	6	NOE	
$\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp}$	<b>A<math>\alpha</math></b>	5.21 [3.8] (-0.02) 92.84 (-0.15)	3.57 (0.03) 72.10 (-0.37)	3.82 (0.10) 72.44 (-1.34)	3.63 (0.21) 80.25 (9.54)	3.94 (0.10) 70.96 (-1.41)	~3.86  60.87 (-0.97)	
$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp}$	<b>A<math>\beta</math></b>	4.65 [8.0] (0.01) 96.72 (-0.12)	3.28 (0.03) 74.83 (-0.37)	3.63 (0.13) 75.43 (-1.33)	3.65 (0.23) 79.40 (8.69)	3.60 (0.14) 75.70 (-1.06)	3.80, 4.65  60.93 (-0.91)	
$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)}$	<b>B</b>	4.50 [8.0] (-0.14) ~103.64 (6.80)	~3.32 (0.07) ~74.05 (-1.15)	~3.50 (0.00) ~76.47 (-0.29)	~3.49 (0.07) 70.38 (-0.33)	3.66 (0.20) 75.74 (-1.02)	3.87, 4.21  69.61 (7.77)	H4, A $\beta$
$\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{)}$	<b>C</b>	4.52 [8.0] (-0.12) ~103.64 (6.80)	~3.32 (0.07) ~74.05 (-1.15)	~3.50 (-0.05) ~76.47 (-0.29)	3.40 (-0.02) 70.51 (-0.20)	3.45 (0.04) 76.88 (0.12)	3.72, 3.91  61.60 (-0.24)	H6a, B; H6b, B

Los valores de  $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$  se encuentran en hertz en paréntesis rectangulares. Las diferencias entre los desplazamientos químicos, comparados con los correspondientes monosacáridos, se encuentran en paréntesis curvos <sup>24</sup>.

La correlación de patrones observada en el espectro  $^1\text{H}, ^1\text{H-TOCSY}$  con un tiempo de mezcla de 100 ms confirmó que el trisacárido posee tres residuos de configuración *gluco*. Los residuos B y C (H1 4.50 y 4.52 ppm) están unidos mediante enlace  $\beta$ , ya que su  $^3J_{1,2}$  es 8.0 Hz en ambos casos. Las resonancias de  $^1\text{H}$ , atribuidas a los sistemas de spin de cada monosacárido fueron correlacionadas con los correspondiente  $^{13}\text{C}$  mediante el espectro de  $^1\text{H}, ^{13}\text{C-HSQC}$ . Las correlaciones de un enlace protón-carbono no asignadas de los residuos A $\beta$ , B y C fueron usadas como información de entrada en el programa CASPER, así como toda la información sobre la identidad de los monosacáridos y tipos de enlace, y los  $^3J_{1,2}$ . En este caso la estructura propuesta por el programa fue  $\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp}$ . Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos en el programa son consistentes con los obtenidos en los experimentos de  $^1\text{H}, ^1\text{H-TOCSY}$  Y  $^1\text{H}, ^1\text{H-NOESY}$ . Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^1\text{H}, ^{13}\text{C-HSQC}$  se encuentran en las figuras del Anexo A.3.5 y A.3.6. Los espectros correspondientes al  $^1\text{H}$  y  $^1\text{H}, ^{13}\text{C-HSQC}$  En función de lo anterior se postula que el compuesto 11 es el  $\beta\text{-D-Glucopiranosil-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glucopiranosil-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glucopiranosido}$  (Figura 3.11).

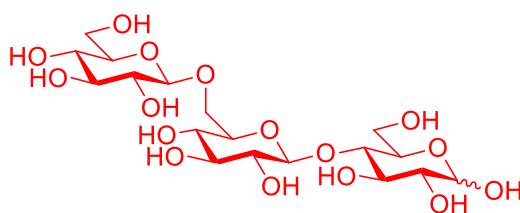


Figura 3.11. Estructura postulada para el compuesto 11

### 3.2.1.3.- Síntesis del trisacárido $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-N-acetilglucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-N-acetilglucopiranosido (compuesto 6)

Se estudió la síntesis enzimática del trisacárido  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-GlcNAc(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAc a partir de ONPG (50 mM) y *N,N'*-diacetilquitobiosa ( $\beta$ -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAcp) (200 mM), como sustratos dador y aceptor de grupo galactosilo respectivamente, en presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (1 UE/mL), a 25°C durante 24 horas (Figura 3.12). El avance de la reacción se siguió por TLC analítica (Figura 3.13).

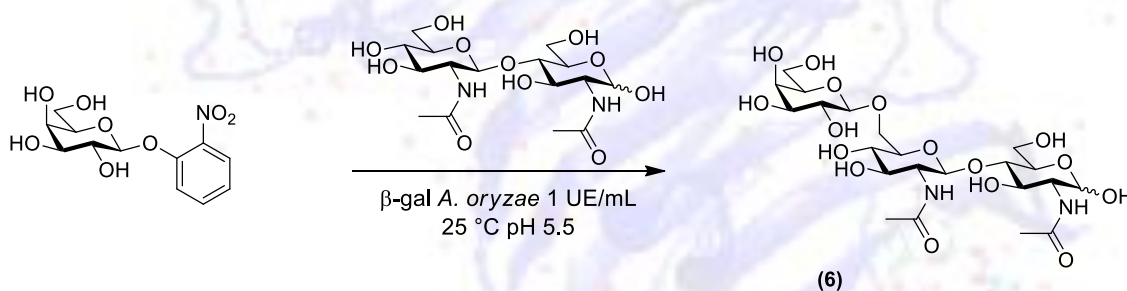
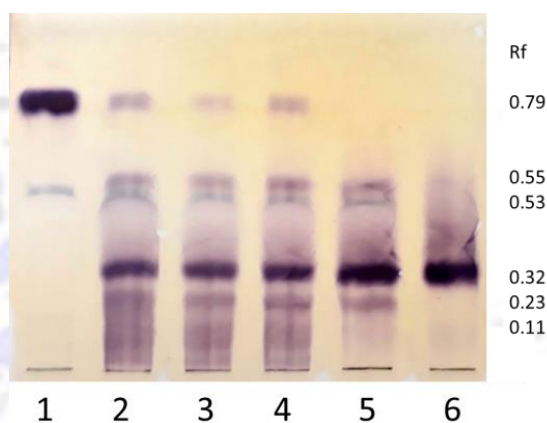


Figura 3.12. Síntesis del compuesto 6

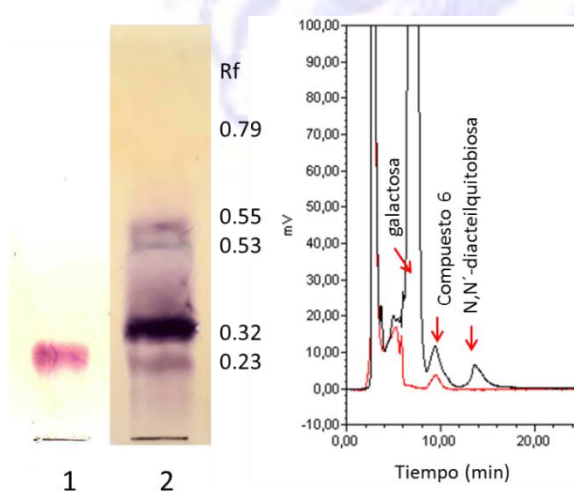
Al inicio de la reacción (t=0h) se observan las bandas de  $R_f$  0.53 y 0.79, correspondientes a los sustratos *N,N'*-diacetilquitobiosa y ONPG respectivamente. A medida que comienza a avanzar la reacción enzimática aparece una banda de  $R_f$  0.32, correspondiente a la galactosa generada como producto de hidrólisis de ONPG, y tres nuevas bandas de  $R_f$  0.11, 0.23 y 0.55. Estas últimas no coinciden con los productos de hidrólisis ni con los sustratos, por lo cual probablemente correspondan a compuestos formados mediante transglucosilación. Tanto la banda de  $R_f$  0.11 como la de 0.55, son detectadas cuando la placa es revelada con el revelador específico para grupo funcional nitro, evidenciando la presencia de dicho grupo en la estructura química de los mismos. Al igual que en la síntesis de los compuestos 3 y 4 estas bandas

corresponden a productos de transglicosilación cuando el ONPG actúa como aceptor y dador de grupo galactosilo. Estas bandas desaparecen al cabo de 24 horas de reacción lo que indica que estos compuestos son productos y sustratos de la enzima a la vez. Dado que el compuesto de  $R_f$  0.23 solo es detectado en presencia de orcinol (específico para carbohidratos) el mismo podría ser el trisacárido buscado. Dicha banda de 0.23 se observa con mayor intensidad al cabo de 3 horas y no disminuye luego de 24 horas de reacción.



**Figura 3.13.** Avance de la reacción de síntesis del compuesto 6 *N,N'*-diacetilquitobiosa (200 mM), ONPG (50 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (1 UE/mL) a 25 °C y pH 5,5: 1-0 h; 2- 1 h; 3- 2 h; 4- 3 h; 5- 24 h; 6- Estándar de galactosa 50 mM.

La banda de  $R_f$  0.23 fue purificada por TLC preparativa y su pureza fue verificada por TLC analítica y HPLC (Figura 3.14).



**Figura 3.14.** Análisis de pureza del compuesto 6 **A:** TLC analítica: 1- Compuesto 6 purificado; 2 -Síntesis con di- *N*-acetil quitobiosa y ONPG a 3 horas. **B:** HPLC: Superposición de los cromatogramas de síntesis enzimática (con *N,N'*-diacetilquitobiosa 200 mM y ONPG 50 mM) a 24 h (trazo negro) y compuesto puro (trazo rojo)

### 3.2.1.3.1. Identificación del compuesto 6

El compuesto purificado fue identificado por RMN y el programa CASPER<sup>25</sup>. Las asignaciones de las resonancias de los protones  $^1\text{H}$  de cada sistema de spin de los monosacáridos fue llevada a cabo realizando un espectro de  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY con diferentes tiempos de mezcla (20, 40, 60 y 100 ms) y un espectro de  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY con un tiempo de mezcla de 500 ms. Las resonancias del residuo localizado en el extremo reductor del trisacárido (A) fue identificado en ambas formas anoméricas  $\alpha$ - y  $\beta$ -piranosa (residuos  $A\alpha$  y  $A\beta$ , respectivamente). La correlación de los patrones en el espectro  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY confirmó que este residuo, junto con el B, presentan configuración *gluco* mientras que el residuo C tiene configuración *galacto*. Los residuos B y C están unidos por enlace  $\beta$  dado que sus constantes de acoplamiento  $^3J_{1,2}$  son 8.5 y 7.9 Hz respectivamente. Las resonancias de  $^{13}\text{C}$  de los residuos de los azúcares, así como los correspondientes al grupo metilo perteneciente al *N*-acetilo, (Me) fueron asignadas usando un espectro de  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC, y los valores asignados a los desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  se observan en la Tabla 3.4. La posición de las sustituciones en los residuos monosacáridos fue determinada mediante los corrimientos en el espectro de  $^{13}\text{C}$  y la secuencia de los residuos en el trisacárido fue confirmada mediante  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ - y  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY. Los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC se encuentran en las figuras del Anexo A.3.7 y A.3.8. Como consecuencia de todo lo anterior, se puede afirmar que el compuesto **6** es  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-*N*-acetil-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-*N*-acetil-glucopiranosido (Figura 3.15).

**Tabla 3.4.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR (ppm) del trisacárido  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-GlcNAcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-GlcNAcp}$  (**6**).

Residuo	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$										
		1	2	3	4	5	6	6'	CO	Me	
$\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}$	$^1\text{H}$	5,17	[2.8]	3,90	3,89	3,62	3,89	3,65	3,79	2,04	
		(-0,04)		(0,02)	(0,14)	(0,13)	(0,03)	(-0,12)	(-0,06)	(-0,02)	
	$^{13}\text{C}$	92,0		54,7	71,1	81,9	71,1	61,5		n.d.	23,49
		(0,2)		(-0,3)	(-0,6)	(10,7)	(-1,4)	(-0,3)			(0,6)
$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpNAc}$	$^1\text{H}$	4,71	[8.2]	3,70	3,58	3,62	3,53	3,65	3,79	2,05	
		(-0,01)		(0,05)	(0,02)	(0,16)	(0,07)	(-0,10)	(-0,12)	(-0,01)	
	$^{13}\text{C}$	96,0		57,2	74,8	81,9	75,8	61,5		n.d.	23,49
		(0,2)		(-0,7)	(-0,0)	(10,9)	(-1,0)	(-0,3)			(0,4)
$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow$	$^1\text{H}$	4,60	[8.5]	3,78	3,58	3,53	3,70	3,86	4,26	2,07	
		(-0,12)		(0,13)	(0,02)	(0,07)	(0,24)	(0,11)	(0,35)	(0,01)	
	$^{13}\text{C}$	103,0		56,8	74,8	71,3	76,2	69,9		n.d.	23,56
		(7,1)		(-1,0)	(-0,0)	(0,2)	(-0,6)	(8,1)			(0,5)
$\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	$^1\text{H}$	4,43	[7.9]	3,53	3,65	3,91	3,68	3,76	3,76		
		(-0,10)		(0,08)	(0,06)	(0,02)	(0,03)	(0,12)	(0,04)		
	$^{13}\text{C}$	104,6		72,2	74,0	70,1	76,6	62,44			
		(7,2)		(-0,7)	(0,2)	(0,4)	(0,6)	(0,6)			

Los valores de  $^3J_{\text{H1,H2}}$  se encuentran en Hertz en paréntesis rectangulares. Las diferencias entre los desplazamientos químicos, comparados con los correspondientes monosacáridos, se encuentran en paréntesis curvos <sup>24</sup>.

Se obtuvo un rendimiento de 47 % expresado como el porcentaje de mg de trisacárido obtenido relativo al máximo esperado (13.1 mg del compuesto **6** fueron obtenidos a partir de 15.0 mg de ONPG, siendo 40.0 mg la máxima cantidad esperada de trisacárido).

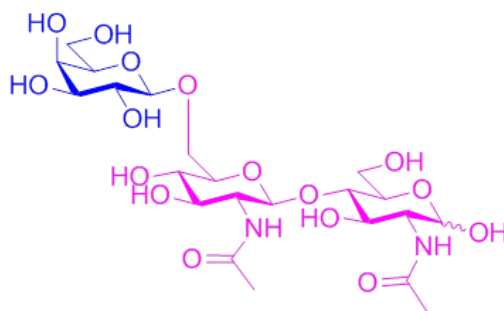


Figura 3.15: Estructura del Compuesto 6.

### 3.2.2. Síntesis de galactósidos de carácter aromático

#### 3.2.2.1- Síntesis del bencil-β-D-galactopiranosido (Compuesto 5)

Con el objetivo de analizar el efecto de sustituir el residuo unido a la galactosa terminal por un anillo aromático, se llevó a cabo la síntesis del compuesto bencil-β-D-galactopiranosido. El mismo fue sintetizado de forma similar a lo previamente reportado por Nilsson et al. 1987, pero usando β-galactosidasa de *A. oryzae* (3 UE/mL) en lugar de β-galactosidasa de *E. coli* <sup>26</sup>. Los sustratos utilizados fueron lactosa (120 mM) como dador de grupo galactosilo y alcohol bencilico (240 mM) como aceptor (Figura 3.16).

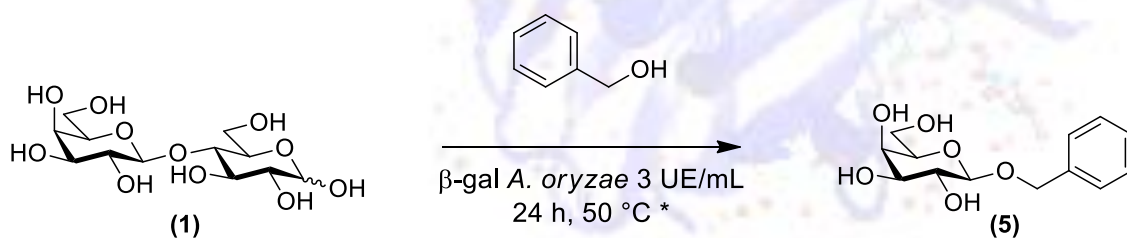
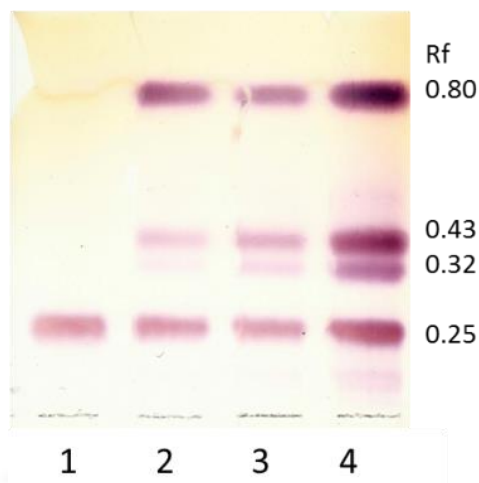


Figura 3.16. Síntesis del compuesto 5

La reacción enzimática fue llevada a cabo a 50° C durante 24 horas. La mezcla de reacción fue analizada por TLC y los resultados se observan en la Figura 3.17.

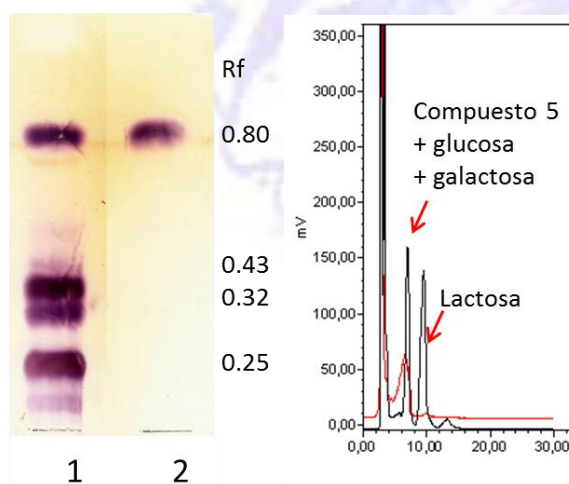




**Figura 3.17.** Avance de la reacción de síntesis del compuesto 5 alcohol bencílico (240 mM), lactosa (120 mM) y  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* (3 UE/mL) a 50 °C y pH 5,5: 1- 0 h; 2- 1 h; 3- 3 h; 4- 24 h.

Además de las bandas de lactosa ( $R_f$  0.25), glucosa ( $R_f$  0.43) y galactosa ( $R_f$  0.32) se observa una nueva banda con  $R_f$  de 0.80, que puede ser atribuida al compuesto esperado bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido (compuesto 5). Una vez más se observa un incremento mayor en la cantidad de glucosa liberada en relación de la galactosa indicando que tienen lugar una reacción de transglucosilación. Resulta claro que el compuesto 5 alcanza un máximo rendimiento al cabo de 24 horas.

Este compuesto fue purificado por TLC preparativa y su pureza fue verificada por TLC analítica y HPLC (Figura 3.18).



**Figura 3.18.** Análisis de pureza del compuesto 5. **A:** TLC analítica: 1 - Síntesis enzimática con lactosa 120 mM y alcohol bencílico 240 mM tiempo 24 h; 2- Compuesto de  $R_f$  0.80 purificado. **B:** HPLC: Superposición de los cromatogramas de síntesis enzimática (con lactosa 120 mM y alcohol bencílico 240 mM) a tiempo 24 h (trazo negro) y compuesto puro (trazo rojo)

### 3.2.2.1.1. Identificación del compuesto 5

La estructura del compuesto **5** fue elucidada por espectroscopía de RMN. Una mezcla de compuestos fue observada en el espectro  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC, pero solo un compuesto con estructura consistente con un carbohidrato ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.46/102.47, 3.54/71.57, 3.61/73.57, 3.92/69.41, 3.67/75.91, 3.67/61.90 y 3.77/61.90). Estos desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  son consistentes con un residuo  $\beta$ -galactopiranososa ( $^3J_{\text{H}1,\text{H}2} = 7.8$  Hz) sustituido en la posición C1 ( $\Delta\delta_{\text{C}1} = 5.10$  ppm). Las resonancias correspondientes al residuo bencílico se observan a  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  7.46/130.22 y 7.41/129.89 (5 protones en total), mientras las resonancias de los  $\text{CH}_2$  se ven a  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.75/72.19 y 4.98/72.19 ppm, confirmando el compuesto **5** es el bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido (Figura 3.19).

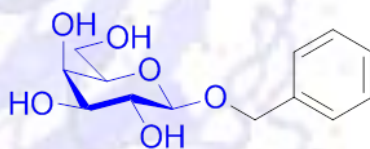


Figura 3.19. Estructura del Compuesto 5.

El rendimiento de la reacción para la síntesis del compuesto **5** fue 27 % expresado como el porcentaje de mg de galactósido obtenido relativo al máximo esperado (9,0 mg de bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido fueron obtenidos a partir de 43.5 mg de lactosa, la máxima cantidad esperada de compuesto **5** es 34.3 mg).

### 3.2.2.2. -Síntesis de otros galactósidos de carácter aromático utilizando dopamina y tirosina como sustratos aceptores.

Adicionalmente se estudió la síntesis enzimática de otros galactósidos con carácter aromático, a partir de ONPG como sustrato dador y tirosina o dopamina (Figura 3.20) como aceptores respectivamente. En ambos casos las síntesis fueron llevadas a cabo durante 24 horas, a temperatura ambiente y concentración de enzima 1 UE/mL, estudiándose distintas combinaciones de concentración de dador y aceptor. El seguimiento de reacción se realizó por TLC analítica.

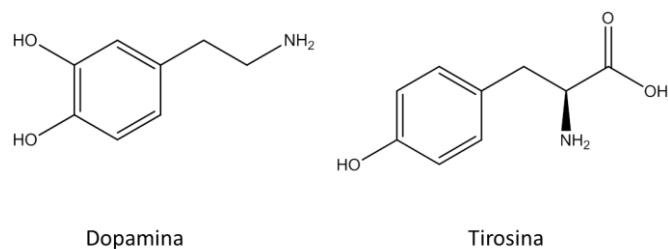
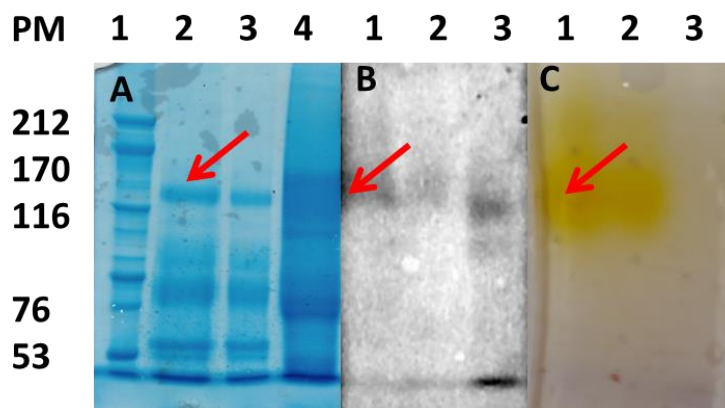


Figura 3.20. Estructura de los aceptores dopamina y tirosina

En ninguna de las condiciones evaluadas, se detectó la síntesis de los galactósidos propuestos, únicamente se observa galactosa como producto de la hidrólisis del ONPG, así como los productos de transglucosilación que se generan cuando el mismo actúa como dador y aceptor de grupo galactosilo (Datos no mostrados).

### 3.2.3. Análisis de pureza de la enzima $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*

Como se mencionó previamente, cuando se realizó la incubación de la enzima  $\beta$ -galactosidasa únicamente con celobiosa ( $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp), contrariamente a lo esperado, se obtiene un producto de síntesis cuya estructura es  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (sección 3.2.1.2.2). En función de estos resultados se plantearon dos hipótesis: o bien que la enzima  $\beta$ -galactosidasa es promiscua y presenta actividad glucosidasa, o que el preparado enzimático contiene como contaminación una  $\beta$ -glucosidasa. Para determinar cuál de las hipótesis planteadas es la correcta, se evaluó la pureza de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* utilizada para la síntesis. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en “espejo”, sembrando la enzima por triplicado junto con un control positivo de actividad glucosidasa (Cytolase PCL5). Se revelaron las proteínas de manera genérica con Coomassie, y por otra parte se realizaron dos revelados específicos: uno con ONPG como sustrato específico para identificar actividad  $\beta$ -galactosidasa, y por otro lado con 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucósido (4-MUG) como sustrato fluorescente específico para actividad  $\beta$ -glucosidasa. Tal como se puede apreciar en la Figura 3.21 si bien se detectan varias bandas de proteínas, la única que desarrolla actividad con los dos sustratos ensayados, 4-MUG y ONPG es la señalada con una flecha en la figura. La misma corresponde a un peso molecular entre 116 y 170 kDa, por lo que según literatura probablemente correspondería a la  $\beta$ -galactosidasa<sup>15,27</sup>.



**Figura 3.21,** SDS-PAGE del extracto  $\beta$ -galactosidasa de *Aspegillus oryzae*  
**A:** Revelado con Coomasie: 1- Estándar de alto peso molecular; 2-  $\beta$ -galactosidasa 4 mg/mL; 3-  $\beta$ -galactosidasa 2 mg/mL; 4- Cytolase PCL5 (control positivo de actividad  $\beta$ -glucosidasa)  
**B:** Revelado con MUGF: 1-  $\beta$ -galactosidasa 4 mg/mL; 2-  $\beta$ -galactosidasa 2 mg/mL; 3- Cytolase PCL5 (control positivo de actividad  $\beta$ -glucosidasa).  
**C:** Revelado con ONPG: 1- $\beta$ -galactosidasa 4 mg/mL 2-  $\beta$ -galactosidasa 2 mg/mL; ; 3-  $\beta$ -glucosidasa Cytolase PCL5 (control positivo de actividad)

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular con el preparado enzimático utilizando una columna Superdex G-200 con rango de fraccionamiento 10 a 600 KDa. A las fracciones eluidas de dicha purificación, se les midió actividad  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa. En el rango de pesos moleculares correspondientes a la  $\beta$ -galactosidasa se detectan dos picos 1 y 2, a  $V_e = 11.6$  mL y  $V_e' = 12.8$  mL respectivamente. Estos se solapan parcialmente en la elución (Figura 3.22). Se observó que el pico 1 (minoritario) solo posee actividad  $\beta$ -glucosidasa mientras que el pico 2, presenta únicamente actividad  $\beta$ -galactosidasa. Esto evidencia que se trata de dos enzimas del extracto de peso molecular muy similar. Esta  $\beta$ -glucosidasa es probablemente la responsable de la generación del compuesto  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp.

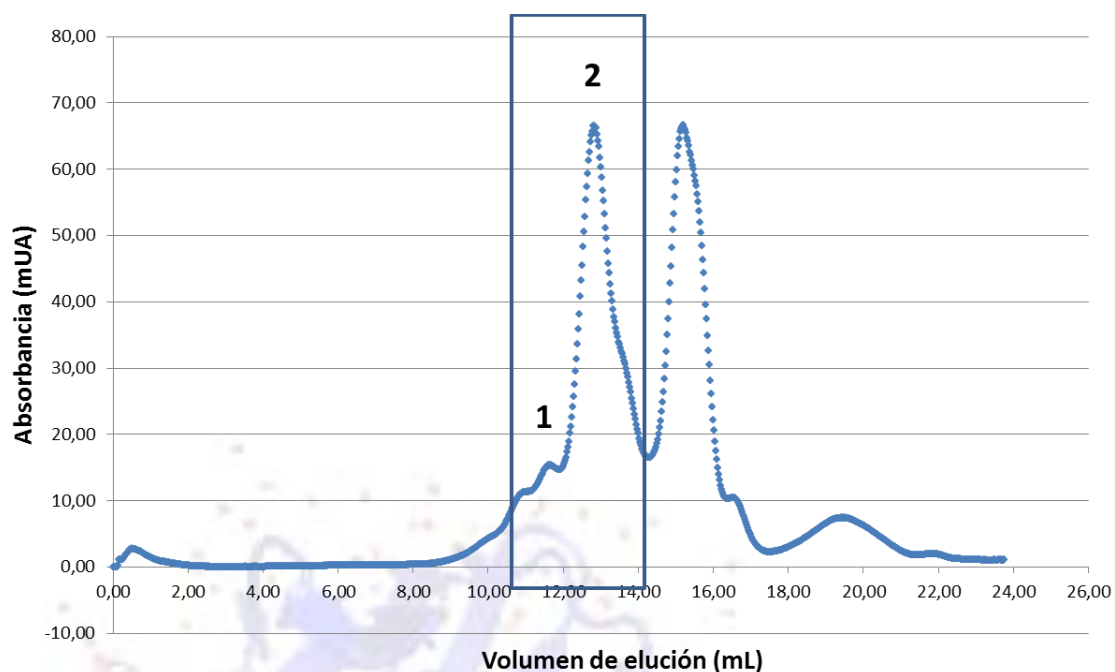


Figura 3.22. Perfil de elución de purificación de extracto de  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*

### 3.3. DISCUSIÓN

En este capítulo se propuso la síntesis enzimática de trisacáridos de fórmula:  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp,  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp,  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAcp, así como también  $\beta$ -D-galactósidos de carácter aromático.

Se sintetizaron exitosamente los trisacáridos:  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**2**); la mezcla de isómeros  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**3**) y  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**4**) y  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAcp (**6**); y el  $\beta$ -galactósido bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido (**5**). Los mismos fueron obtenidos con rendimientos entre 16 y 47%.

En las síntesis de los compuestos **2** y **6**, en los que lactosa y *N,N'*-diacetilquitobiosa eran los aceptores, la galactosa se unió al aceptor mediante enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). Sin embargo cuando la celobiosa actúa como molécula aceptora del grupo galactosilo, se obtiene una mezcla de isómeros donde la galactosa transferida se une al extremo no reductor del aceptor mediante los enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), obteniéndose los

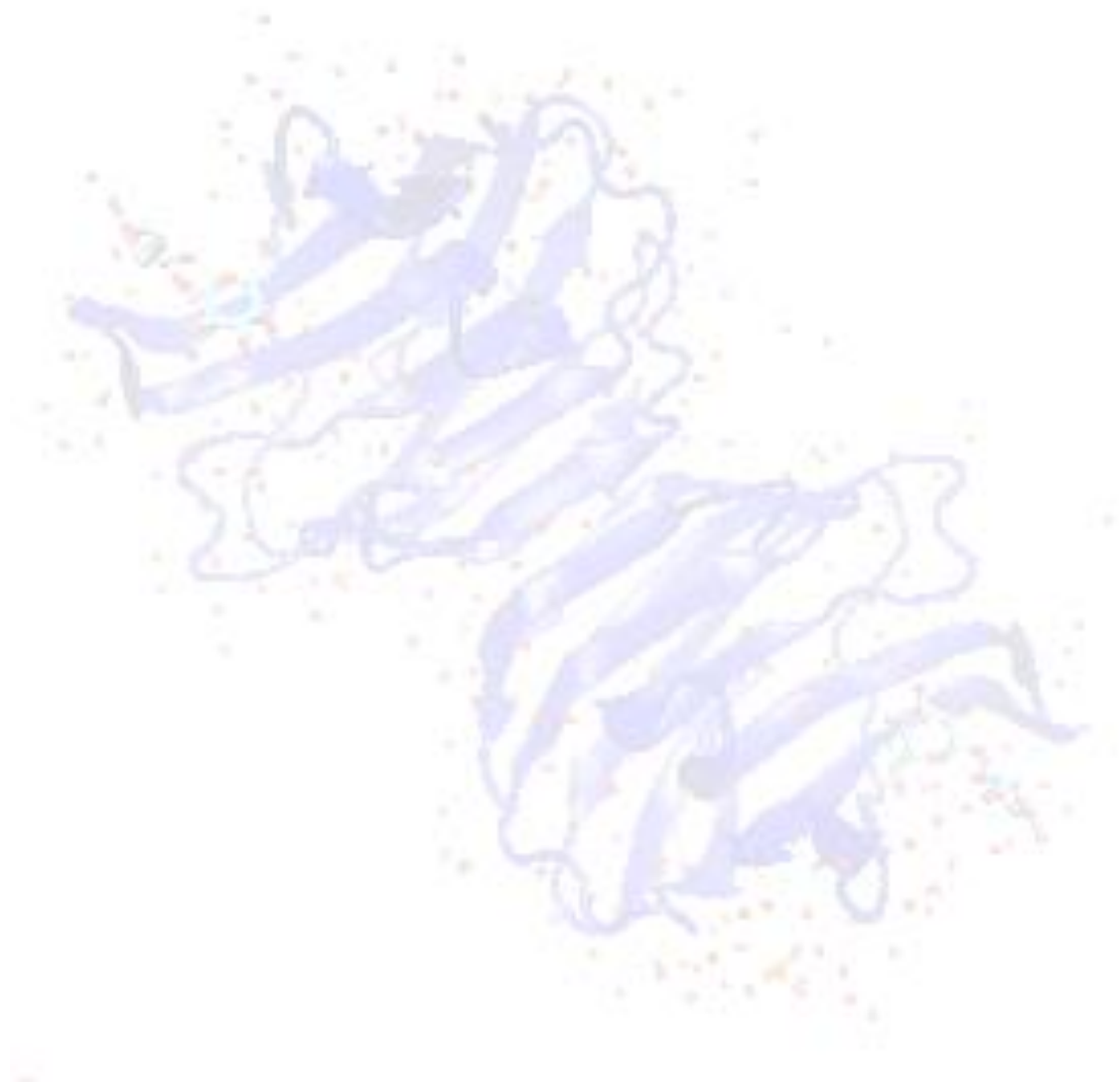
compuestos **3** y **4**. Esto pone de manifiesto que la estructura del aceptor afecta la regioselectividad de la enzima. Esto puede deberse a que aquí no solo están en juego la diferente nucleofilia de los hidroxilos del aceptor sino también efectos estéricos, que dificultan el acceso y posicionamiento en el sitio activo del aceptor, haciendo favorable solo la unión a través del hidroxilo del C6, que se encuentra menos impedido que los otros hidroxilos. Los nuevos enlaces glicosídicos formados, son en todos los casos,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), no observándose  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Estos resultados son coincidentes con lo reportado en bibliografía en relación a la regioselectividad de la  $\beta$ -galactosidasa de *A oryzae*<sup>15</sup>.

Los compuestos **2**, **3** y **4** alcanzan su máximo rendimiento de síntesis en tiempos cortos de reacción (2-3 horas), lo que evidencia que a tiempos más largos tiene lugar la hidrólisis enzimática de los mismos observándose hidrólisis total al cabo de 24 horas. Esto indica que estos compuestos no solo son productos de transglicosilación sino también sustratos de la enzima. En las condiciones de reacción estudiadas los compuesto **5** y **6**, bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido y  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAcp, se comportan de manera diferente, no siendo hidrolizados por la enzima.

Con respecto a la síntesis de compuestos aromáticos, se logró la obtención del compuesto bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido, pero no se logró la síntesis cuando los aceptores fueron tirosina y dopamina. La diferencia fundamental entre las agliconas aceptoras con carácter aromático ofrecidas al sistema de transglicosilación es la nucleofilia de los hidroxilos del aceptor, que deben competir con el agua por la molécula de galactosa. En el caso del alcohol bencílico el hidroxilo es un alcohol primario, y en los otros dos casos son hidroxilos fenólicos. Estos últimos presentan baja nucleofilia dado su cercanía al anillo aromático lo que justificaría la no formación de los galactósidos propuestos con tirosina y dopamina, dado que la reacción que predomina es la hidrólisis del dador.

Finalmente, si bien se detectó la presencia de una  $\beta$ -glucosidasa en el extracto enzimático, la misma no interfiere en la síntesis de los galactósido de interés, ya que su actividad solo se aprecia cuando la celobiosa es el único compuesto en la mezcla. Dado que en presencia de ONPG y celobiosa, no se ve la formación del compuesto  $\beta$ -D-Glcp-

(1→6)-β-D-Glcp-(1→4)-D-Glcp, (o al menos no se visualiza con la técnica analítica TLC seleccionada para nuestros ensayos), una posible explicación es que la actividad glucosidasa sea inhibida por el ONPG, ya que las otras condiciones de la reacción (pH, temperatura, tiempo) permanecen incambiadas.

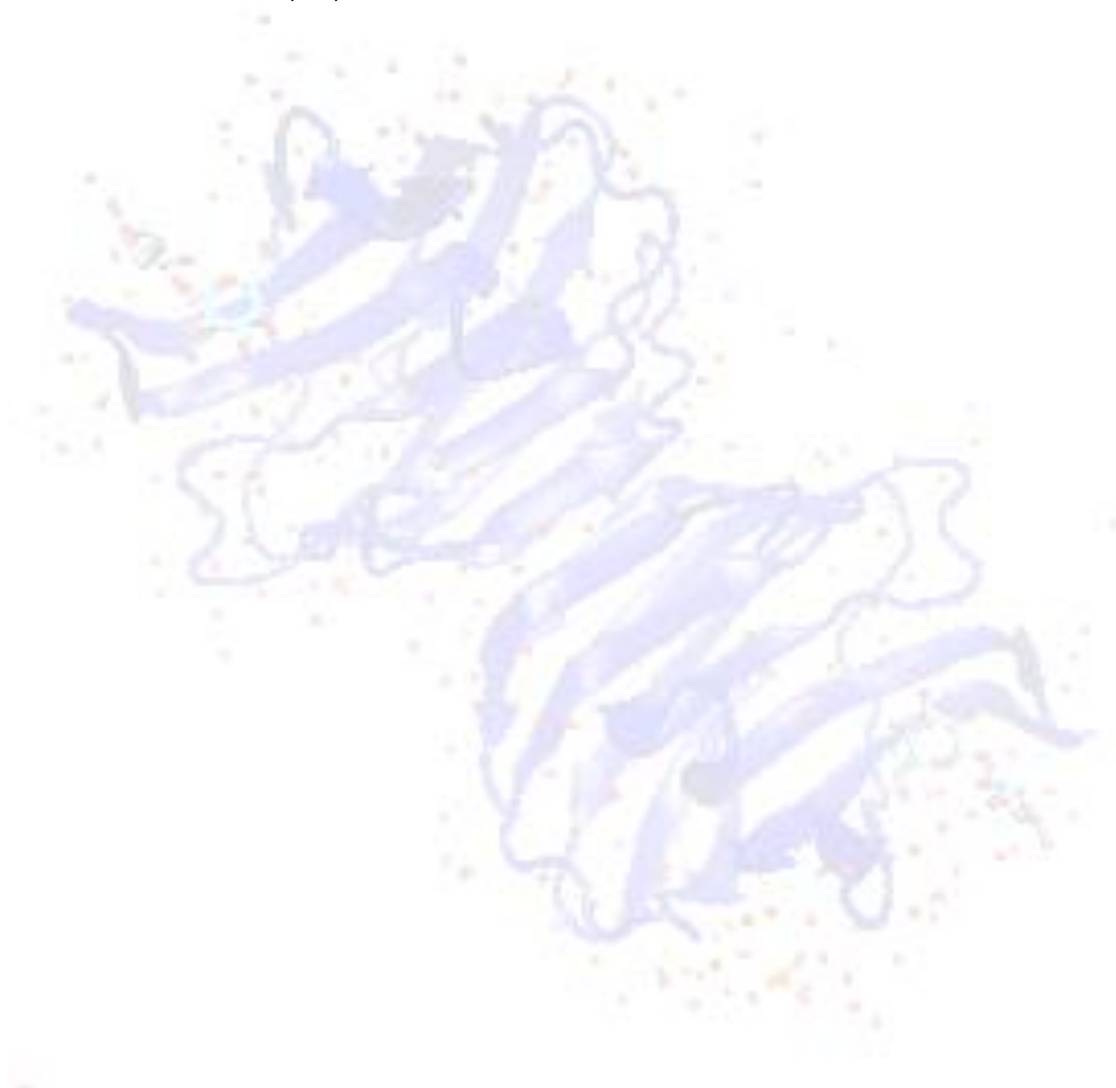


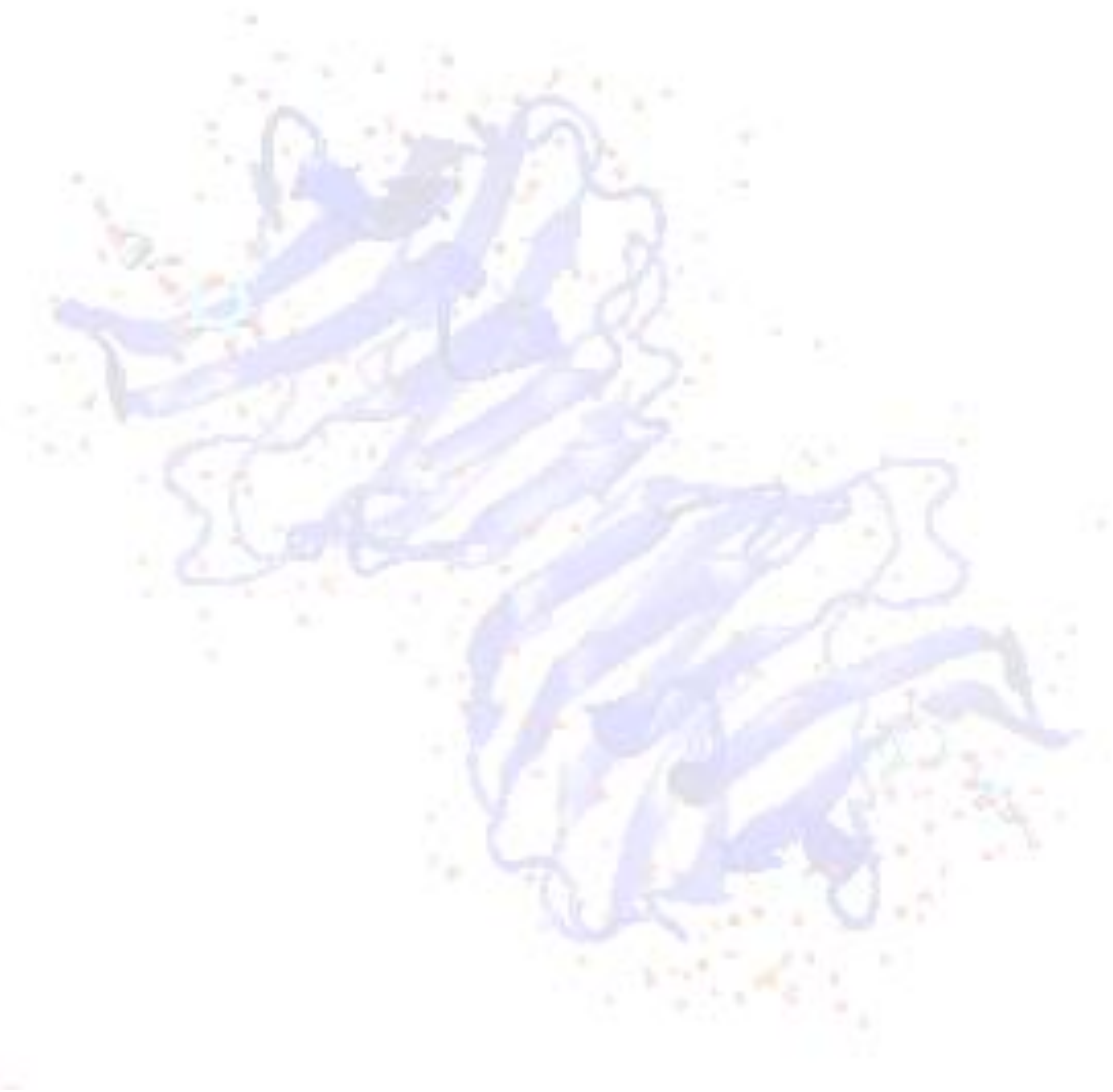
### 3.4. BIBLIOGRAFÍA


- (1) Faber, K. *Biotransformations aid organic chemists*, 6th ed.; Springer, Ed.; Berlin, 2011.
- (2) Taylor, M. E.; Drickamer, K.; Schnaar, R. L.; Etzler, M. E.; Varki, A. In *Essentials of Glycobiology [Internet]*; Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., E., Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2017; pp 1–12.
- (3) Yu, B.; Sun, J.; Yang, X. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (8), 1227–1236.
- (4) Sarry, J. E.; Günata, Z. *Food Chem.* **2004**, *87* (4), 509–521.
- (5) Van Rantwijk, F.; Woudenberg-Van Oosterom, M.; Sheldon, R. a. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **1999**, *6* (6), 511–532.
- (6) Bojarová, P.; Kren, V. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27* (4), 199–209.
- (7) Ichikawa, Y.; Look, G. C.; Wong, C.-H. *Anal. Biochem.* **1992**, *202*, 215–238.
- (8) Daines, A. M.; Maltman, B. A.; Flitsch, S. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, 106–113.
- (9) Hancock, S. M.; Vaughan, M. D.; Withers, S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 509–519.
- (10) Binder, W. H.; Kiihlig, H.; Schmid, W. *Tetrahedron* **1995**, *6* (7), 1703–1710.
- (11) Binder, W.; Kahlig, H.; Schmid, W. *Tetrahedron* **1994**, *50* (35), 10407–10418.
- (12) Scheckermann, C.; Wagner, F.; Fischer, L. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *0229* (96), 629–634.
- (13) Park, Y. K.; De Santi, M. S. S.; Pastore, G. M. *J. Food Sci.* **1979**, *44* (1), 101–103.
- (14) Okahata, Y.; Mori, T. *Focus (Madison)*. **1997**, *151* (February), 50–54.
- (15) Porciúncula González, C.; Giacomini, C.; Irazoqui, G. In *Beta-galactosidase: Properties, structure and functions*; Eloy Kras, Ed.; Nova Science Publishers, Inc: New York, 2019; pp 65–115.
- (16) Porciúncula González, C.; Castilla, A.; Garófalo, L.; Soule, S.; Irazoqui, G.; Giacomini, C. *Carbohydr. Res.* **2013**, *368*, 104–110.
- (17) Porciúncula González, C.; Rodríguez, E.; Soule, S.; Franco, L.; Brena, B. M.; Giacomini, C.; Irazoqui, G.; *Biocatal. Biotransfor.* **2015**, *2422*, 1–12.
- (18) Irazoqui, G.; Bustamante, M. J.; Castilla, A.; Villagrán, L. V.; Batista-Viera, F.; Brena, B. M.; Giacomini, C. *Biocatal. Biotransfor.* **2013**, *31* (1), 57–65.
- (19) Porciúncula González, C. Desarrollo de sistemas de transglicosilación enzimática para la generación de compuestos bioactivos, Universidad de la República, **2014**.
- (20) Meynier, C.; Guerlesquin, F.; Roche, P. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2009**, *27* (1), 49–57.
- (21) Meynier, C.; Feracci, M.; Espeli, M.; Chaspoul, F.; Gallice, P.; Schiff, C.; Guerlesquin, F.; Roche, P. *Biophys. J.* **2009**, *97* (12), 3168–3177.



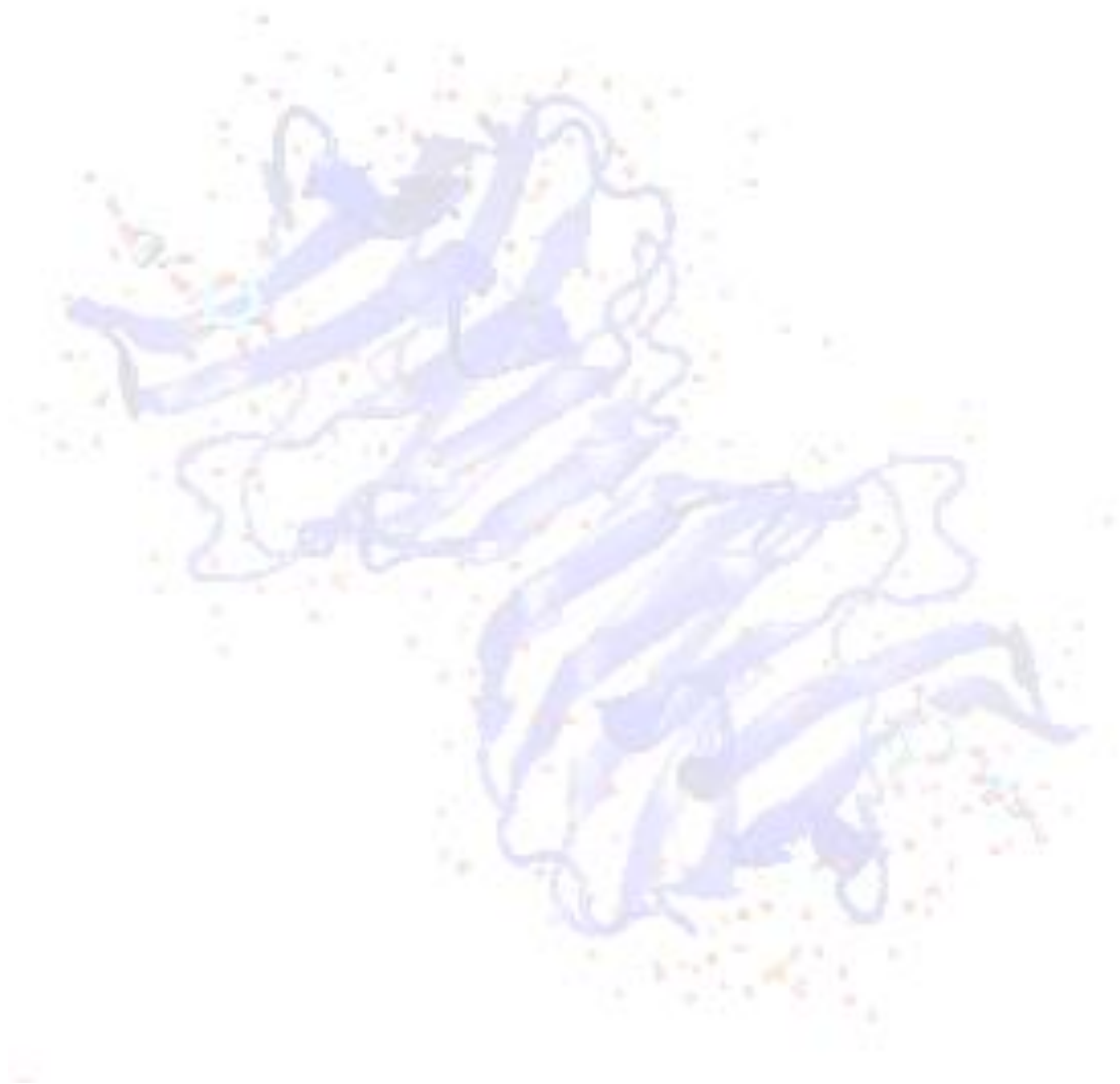
- (22) Oberg, C. T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Glycochemistry Today* **2011**, 65 (1), 1–5.
- (23) Peterson, K.; Collins, P. M.; Huang, X.; Kahl-Knutsson, B.; Essén, S.; Zetterberg, F. R.; Oredsson, S.; Leffler, H.; Blanchard, H.; Nilsson, U. J. *RSC Adv.* **2018**.
- (24) Jansson, P.-E.; Kenne, L.; Wildman, G. *Carbohydr. Res.* **1989**, 188, 169–191.
- (25) Lundborg, M. **2011**, 1514–1517.
- (26) Nilsson, K. G. I. *Carbohydr. Res.* **1988**, 180, 53–59.
- (27) Maksimainen, M. M.; Lampio, A.; Mertanen, M.; Turunen, O.; Rouvinen, J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 60, 109–115.







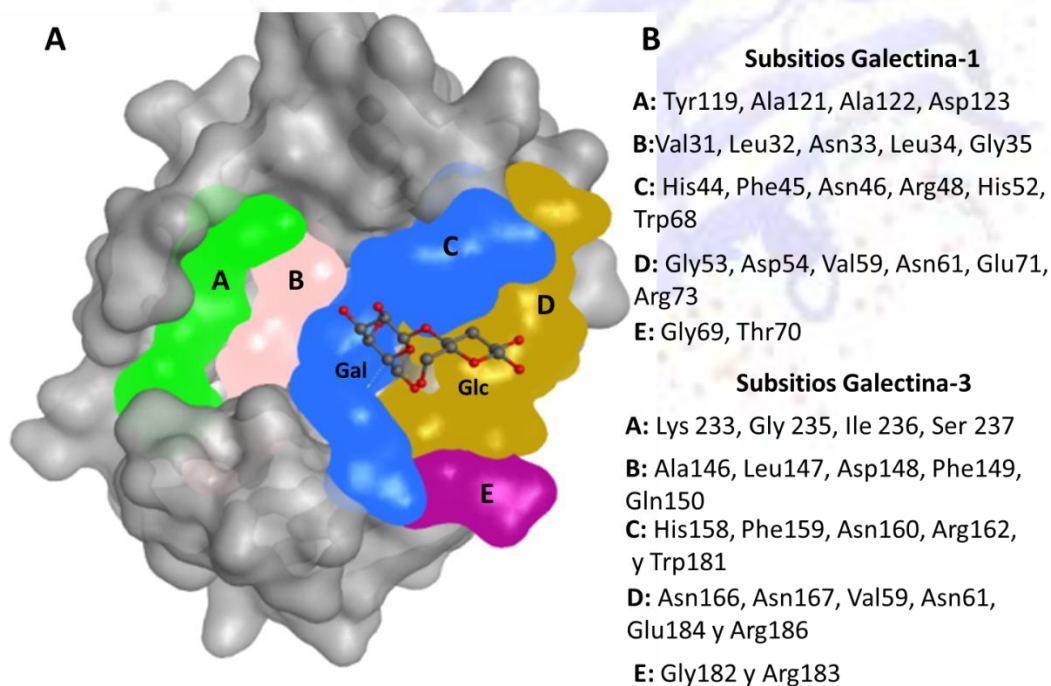
**Capítulo 4:**  
**Desarrollo del modelo teórico de  
interacción galectina-carbohidrato**



## 4.1. INTRODUCCIÓN

Los oligo- y polisacáridos que forman parte de las glicoproteínas y glicolípidos juegan un importante rol en distintos procesos biológicos. Como se ha mencionado previamente, estos glicanos, interaccionan con distintas proteínas, como las lectinas, desencadenando procesos tales como reconocimiento, adhesión y migración celular. Es por esta razón que son considerados la tercer clase de moléculas que codifican información biológica<sup>1-3</sup>.

Las galectinas por su parte son lectinas que comparten un dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC) altamente conservado, que presentan afinidad por  $\beta$ -galactósidos. Los residuos que constituyen el DRC de las distintas galectinas se agrupan en cinco subsitios nombrados A, B, C, D y E (Figura 4.1). En los subsitios C y D, se dan las interacciones principales entre un residuo de galactosa y la proteína. Dichas interacciones involucran múltiples enlaces de hidrógeno (O4 e His44 y Arg48; O6 y Asn61 y Glu71 para hGal-1; O4 e His158 y Arg162; O6 y Asn174 y Glu184 para hGal-3) e interacciones de tipo van der Waals  $\pi$ -H entre un residuo de triptofano conservado y la cara B del anillo galactopiranosico<sup>2,4,5</sup>.



**Figura 4.1.** **A:** Dominio de reconocimiento para carbohidratos (DRC) para galectina 1 (Mapa de superficie pdbID: 1GZW); **B:** Aminoácidos que componen los subsitios de hGal-1 y hGal-3.

Los subsitios A, B y E también interactúan con el ligando, determinando la especificidad por el mismo. Diferencias en los subsitios A, B, D y E son las que hacen que la selectividad entre galectinas por un mismo ligando sea diferente. Desde el punto de vista estructural, los monosacáridos y polisacáridos son moléculas sumamente desafiantes debido a su flexibilidad y a la presencia de numerosos grupos hidroxilo polares. Es por ello que la determinación de su estructura y más aún de su interacción con las proteínas resulta muy complicada. Dada su movilidad intrínseca, el uso de la cristalografía de rayos X en carbohidratos es más limitado. Por esa razón, los métodos computacionales y en particular las simulaciones de dinámica molecular (DM) son un excelente complemento para una adecuada caracterización, tanto a nivel estructural como funcional de los glicanos y glicoconjugados <sup>1</sup>. La DM se basa en la ecuación correspondiente a la segunda ley de Newton, la cual relaciona la fuerza (F) que actúa sobre un átomo con la aceleración del mismo. Mediante distintos algoritmos matemáticos se resuelve dicha ecuación relacionándola con la energía correspondiente a la molécula. Una simulación de DM, describe el movimiento de un grupo de átomos (una molécula o más) por aplicación de un campo de fuerzas, durante el tiempo que dure dicha simulación <sup>6,7</sup>. Producto de esa simulación se obtiene la *trayectoria*.

Se han desarrollado diversos programas en la búsqueda de modelos que logren simular adecuadamente la realidad experimental (NAMD, GROMACS, AMBER, MOE, etc.). Dado que los modelos son aproximaciones, cuanto mejor sea el modelo, más se ajustará a la realidad experimental.

Por otra parte, el docking molecular es una estrategia computacional que permite modelar la interacción entre un ligando y un receptor, siendo una herramienta muy útil para predecir interacciones entre los mismos. Esta técnica se basa en posicionar el ligando (*placement*) en distintas conformaciones y orientaciones (*poses*) y calcular geometrías y energías óptimas (*scoring*) en la interacción con el receptor. Para ello utiliza distintos algoritmos de *placement* y *scoring* dependiendo de cuál sea el sistema de estudio <sup>6,8-10</sup>.

Dado que a lo largo de todo este capítulo, se describen distintos análisis de RMSD entre distintas estructuras, es conveniente en este momento definirlo. El RMSD (por su sigla en inglés Root-Mean-Square Deviation) o Desviación de la Media Cuadrática, es la medida de la diferencia promedio de la distancia entre los átomos de las proteínas u otras moléculas superpuestas. Se calcula de la siguiente manera:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (r_i(t_o) - r_i(t))^2}$$

Ecuación 1

Donde **N** es el número total de átomos,  $r_i(t_o)$  y  $r_i(t)$  las coordenadas de los átomos al inicio de la simulación y a un tiempo  $t$ .

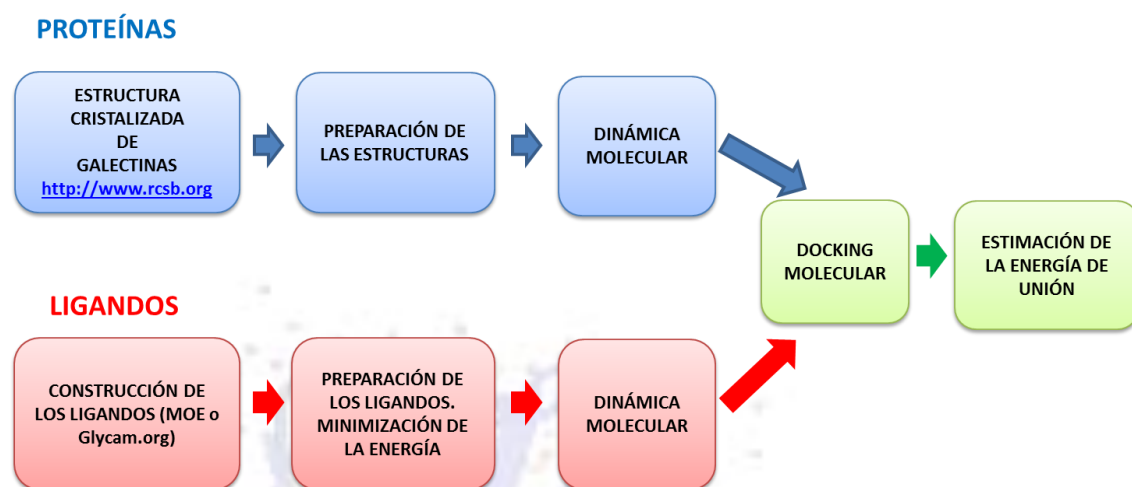
El objetivo de este capítulo es generar modelos teóricos que sean capaces de representar y predecir las interacciones galectina-carbohidrato.

Para cumplir con dicho objetivo, se generaron estructuras adecuadas tanto de los ligandos como de las galectinas mediante distintas estrategias para realizar simulaciones de DM. Posteriormente se realizaron estudios de docking molecular para determinar las interacciones entre ambos

## 4.2. RESULTADOS

En el esquema 4.1 se ilustra la estrategia metodológica seguida. Se descargó del Protein Data Bank (PDB) una estructura cristalizada de una galectina y se le hicieron las modificaciones necesarias para poder realizar una simulación de DM utilizando los programas MOE y GROMACS. A continuación, se seleccionaron las mejores estructuras para los estudios posteriores de docking molecular. Por otro lado, para la construcción de los carbohidratos se utilizaron dos programas diferentes (MOE o Glycam) dependiendo del método de docking a utilizar, y se seleccionaron las estructuras de menor energía. Finalmente se realizaron estudios de docking molecular utilizando los

programas AUTODOCK y Schrödinger donde se seleccionó la mejor pose y se estimó la energía libre de unión.



Esquema 4.1. Estrategia metodológica.

#### 4.2.1. Preparación de galectinas.

##### 4.2.1.1. Selección de estructuras cristalizadas.

El PDB agrupa hasta el momento 223 estructuras de galectinas humanas (<http://www.rcsb.org/pdb> Fecha acceso: 4/10/2019), 219 obtenidas por cristalografía de rayos X y solo 4 por RMN. De ellas un 15% corresponden a galectina-1 (hGal-1) (31 estructuras) y casi un 34 % a galectina-3 (hGal-3) (75 estructuras). A pesar de la gran cantidad de estructuras cristalizadas de hGal-3, en ningún caso se ha cristalizado la proteína entera, sino una fracción de 16 kDa correspondiente al DRC que comienza en general a partir del aminoácido Pro117. Las estructuras cristalográficas más representativas de ambas galectinas, fueron seleccionadas y descargadas del PDB <sup>11</sup> y superpuestas en MOE <sup>12</sup>. Se observa un alto grado de similitud entre las estructuras descargadas (RMSD: 0.855 Å para hGal1 y RMSD: 0.317 Å para hGal-3) (Anexo A.4.1 y A.4.2). En función de este resultado se acotó la cantidad de galectinas a utilizar a las más citadas para este tipo de estudios, que contaran con adecuada resolución (menos de 1.5 Å), priorizando aquellas cuyo ligando cristalizado fuera lactosa o *N*-acetil-lactosamina (LacNAc). Tomando en cuenta estos criterios se seleccionaron las



estructuras 1GZW<sup>13</sup> y 4Q26 para hGal-1, y 3ZSJ<sup>14</sup> y 1A3K<sup>15</sup> para hGal-3 para los estudios posteriores.

#### 4.2.1.2. Comparación de las estructuras de hGal-1 y hGal-3

Las estructuras de hGal-1 y hGal-3 fueron alineadas y superpuestas utilizando MOE 2011.10<sup>12</sup>. La similitud de secuencia y los porcentajes de identidad fueron calculados (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Alineamiento y análisis de las secuencias de hGal-1 y hGal-3. El grado de similitud entre las galectinas fue calculado con respecto a hGal-1. Las barras azules (positiva) y rojas (negativas), representan residuos similares o diferentes respectivamente. El % de identidad de hGal-3 fue calculado respecto a hGal-1 y se representa con barras rosas. Los aminoácidos pertenecientes al subsitio C están resaltados en verde oscuro para hGal-1, y en verde claro para hGal-3.

Además del análisis de secuencia, se analizaron también las estructuras superpuestas del monómero de hGal-1 con el DRC de hGal-3 (Figura 4.3). El RMSD global entre ambas galectinas es de 2.01 Å. Observando los subsitios superpuestos, se puede apreciar que los residuos pertenecientes al subsitio C son conservados en ambas galectinas, a excepción de la His52, la cual está ausente en hGal-3. Los demás subsitios presentan diferencias de distinta entidad entre ambas galectinas. Esas diferencias se pueden apreciar en la figura 4.3.

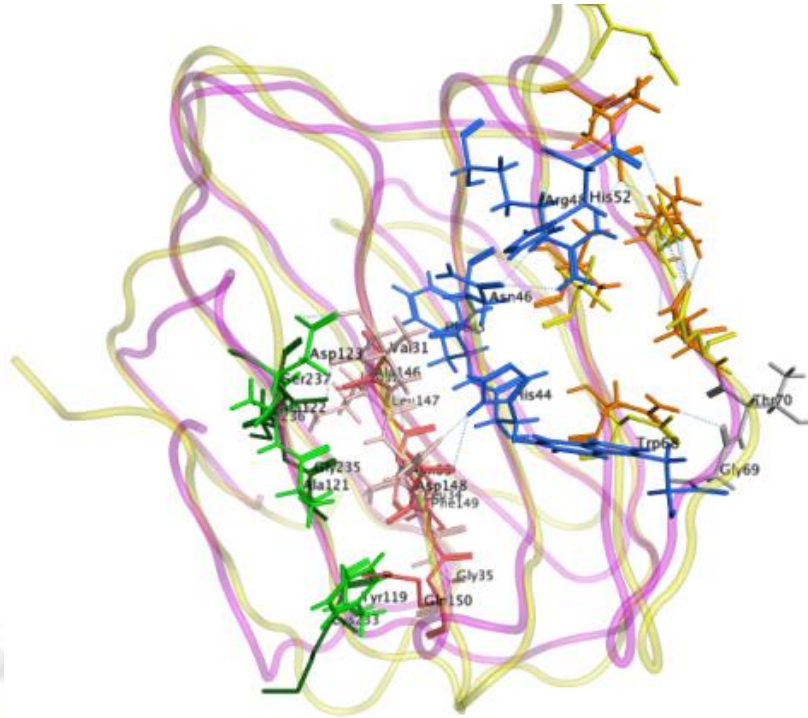


Figura 4.3. Superposición de hGal-1 (cadena violeta) y hGal-3 (cadena amarilla), se muestran los residuos de los aminoácidos que componen el DRC.

En la figura 4.4, se muestra un análisis más detallado de los distintos subsitios incluyendo el RMSD entre los aminoácidos que forman cada uno.

Si se observa el subsitio A, se ve que las mayores diferencias se encuentran en los aminoácidos Tyr119 de hGal-1 y Lys233 de hGal-3 y entre Asp123 en hGal-1 respecto Ser237 en hGal-3. Mientras que la cadena lateral de la Tyr119 consiste en un grupo aromático sin carga, Lys233 es un aminoácido cargado. Por su parte mientras que Asp123 posee un grupo carboxílico que a pH fisiológico se encuentra cargado negativamente, la Ser237, es polar pero no cargada. Estas diferencias demuestran que la diferencia no solo es espacial, sino que afecta a las posibles interacciones con un potencial ligando, ya que la reactividad de los aminoácidos mencionados previamente, es diferente en ambas galectinas.

Con respecto al subsitio B, la mayor diferencia la observamos entre los aminoácidos Gly35 y Gln150. Sin lugar a dudas las características de estos aminoácidos son diferentes, mientras que Gly35 es un aminoácido pequeño (su cadena lateral es un hidrógeno), Gln150 es un aminoácido de cadena lateral con 3 carbonos y un grupo amida en su estructura. Por otra parte, si bien espacialmente la Asn33 con respecto al

Asp148 no difiere sustancialmente, sus propiedades son distintas, ya que la cadena lateral de la Asn33 posee un grupo amida y en el caso del Asp148 en su lugar hay un carboxilato.

El subsitio D es conocido por ser el sitio de unión al segundo azúcar unido al carbono anomérico de la galactosa. La mayoría de los residuos de este subsitio son idénticos en ambas galectinas, a excepción de la Gly53 y Asp54 en hGal-1, los cuales son sustituidos por Asn166 y Asn167 en hGal-3.

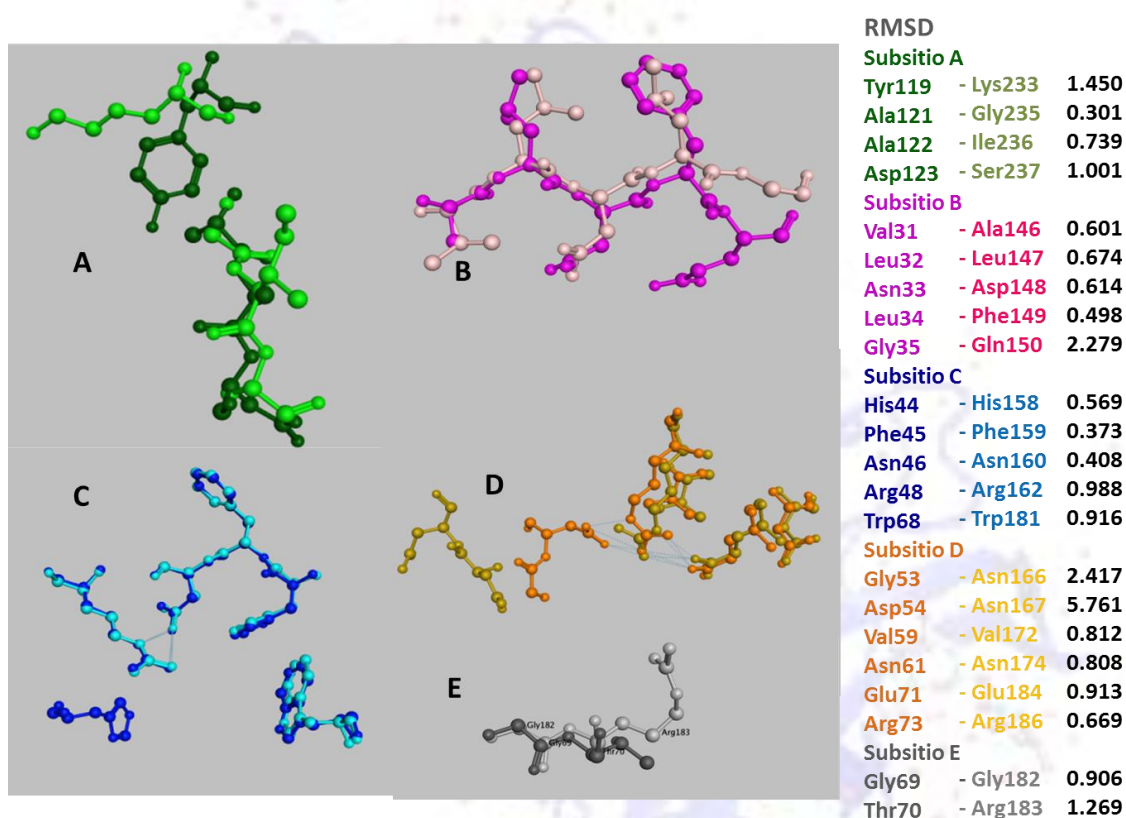


Figura 4.4: Análisis de los subsitios superpuestos y cálculo de RMSD

Finalmente, en el subsitio E, formado por dos aminoácidos, la mayor diferencia se observa entre Thr70 de hGal-1 y Arg183 de hGal-3. Al igual que en los subsitios A, B y D, estos aminoácidos, presentan diferencias importantes en su estructura, ya que Thr70 es un residuo pequeño, polar pero no cargado mientras que Arg183 es más grande y cargado.

Todas estas diferencias estructurales mencionadas previamente podrían justificar una diferencia de selectividad entre ambas galectinas.

#### **4.2.2. Estudios de dinámica molecular en hGal-1 y hGal-3.**

##### **4.2.2.1. Dinámica molecular de hGal-1 y hGal-3 empleando MOE**

Estos experimentos se realizaron para hGal-1 y hGal-3 coordinadas con sus correspondientes ligandos. Para ello se utilizaron las siguientes estructuras: pdb ID: 1GZW (correspondiente a hGal-1 coordinada con lactosa) y 1A3K (correspondiente a hGal-3 coordinada con LacNAc).

La simulación se llevó a cabo durante 10 ns, registrando posición y energía cada 0.5 ps (es decir, cada 0.5 ps de la simulación se registra la posición y la energía de los átomos), con un time step de 2 fs para ambas galectinas en presencia del ligando coordinado. Se empleó el campo de fuerzas AMBER99 provisto por dicho software. Este campo de fuerzas está parametrizado para proteínas y ácidos nucleicos, no siendo un modelo tan adecuado para carbohidratos.

La estabilidad y propiedades dinámicas de las proteínas en una simulación dependen altamente de la solvatación y fuerzas electrostáticas. Es por esa razón que como parte de las condiciones para la simulación se debe tener en cuenta la correcta solvatación del sistema a simular. En este caso el procedimiento general fue el siguiente: una vez descargada las estructuras del PDB <sup>11</sup>, se analizaron las mismas corrigiendo las inconsistencias presentes (cisteínas oxidadas, átomos de Cl<sup>-</sup> y SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> adicionados para colaborar con el proceso de obtención de la proteína cristalizada). En el caso de hGal-1 se utilizó la estructura del dímero cristalizado, mientras que para hGal-3 se utilizó la fracción de estructura cristalizada correspondiente al DRC. Posteriormente las estructuras se protonaron a pH 7 mediante la herramienta *Protonate 3D* de MOE, verificando el estado de protonación de los aminoácidos de la proteína con énfasis en las histidinas presentes en el DRC (His44 y His52 en hGal-1, e His158 en hGal-3). Para la solvatación del sistema, se generó una caja de aguas cúbica. El modo de solvatación seleccionado fue el modo “Droplet” o de gota. Dicho modo genera un sistema aperiódico con condiciones límite elipsoidales o rectilíneas y el tipo de geometría que

se utiliza es una caja de aguas. Finalmente se adicionaron iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de forma de simular el medio fisiológico. Este procedimiento fue análogo para hGal-1 y hGal-3. La simulación se llevó a cabo a 300 K, con 100 ps de equilibrado y 10 ns de producción en el caso de hGal-1 y 7 ns para hGal-3.

Los resultados de la dinámica fueron similares para ambas galectinas. En el caso de la hGal-1 se observa que la energía total se estabiliza en menos de 1000 ps, manteniéndose así durante todo el proceso (Figura 4.5). La hGal-3 se mantiene estable desde el principio y a lo largo de toda la simulación. En las estructuras seleccionadas la hGal-1, se encuentra asociada a una molécula de lactosa, mientras que el DRC de hGal-3, se encuentra en coordinación con una molécula de LacNAc.

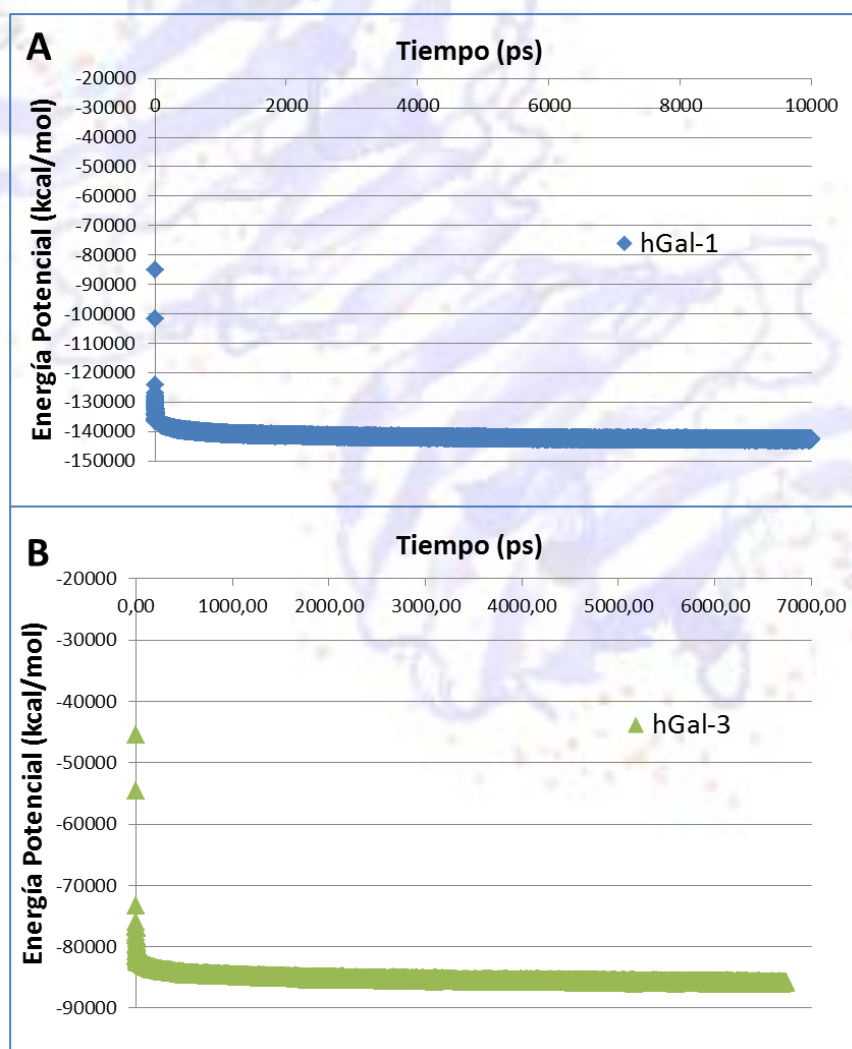
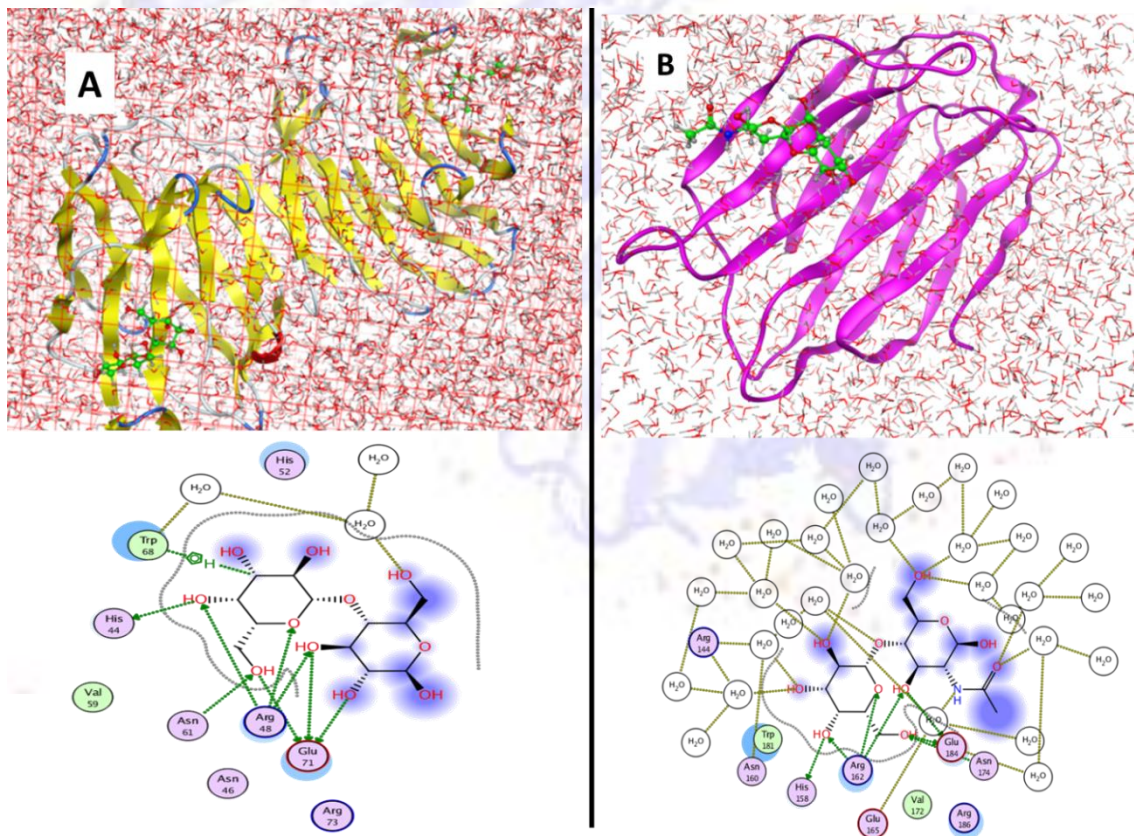


Figura 4.5. Perfil de energía en función de tiempo de la simulación de DM de hGal-1 (A) y hGal-3 (B).

Tal como se aprecia en las figuras 4.6A y 4.6B, el DRC de ambas galectinas se encuentra muy expuesto al medio, lo que representa un desafío adicional para que haya una buena interacción proteína-ligando. Como se puede observar en dicha figura, el disolvente interacciona con el ligando.

En la figura 4.6A se observan las principales interacciones entre lactosa y el DRC de la hGal-1 humana. Se aprecian las interacciones por enlace de hidrógeno características entre los residuos de Arg48 e His44 con el hidroxilo del C4, y de Asn61 y Glu71 con el hidroxilo C6 de la galactosa al igual que del residuo de Arg48 con el hidroxilo del C3 de la glucosa y del Glu71 con los hidroxilos de los C2 y C3 de la glucosa, confirmando lo reportado en datos previos disponibles en la literatura <sup>4,5</sup>. Para evaluar la importancia de dichas interacciones se analizó la variación de la distancia entre los aminoácidos correspondientes y el ligando, con su RMSD correspondiente a lo largo de toda la trayectoria (Anexo A 4.3).



**Figura 4.6.** Análisis de interacción disolvente-galectina-ligando durante la simulación: A: hGal-1; B: hGal-3.

Se midieron las distancias entre los O4 y O6 de la galactosa y átomos clave de los residuos: entre O4 y los residuos His44 (N $\epsilon$ 2) y Arg48 (NH<sub>2</sub>); entre O6 y , Asn61 (N $\delta$ 2) y Glu71 (O $\epsilon$ 2) y finalmente entre la His52 (N $\delta$ 2) y el O2. En todos los casos analizados, a excepción de la His52 (N $\delta$ 2), las distancias calculadas variaron menos de 0.6 Å. La distancia entre la His52 y el O2 presentó diferencias un poco mayores a lo largo de toda la trayectoria. Estos resultados, corroboran la interacción entre estos átomos principalmente mediante enlaces de hidrógeno muy fuertes, ya que a pesar del entorno altamente hidrofílico circundante, el RMSD nunca superó los 0.6 Å (Anexo 4.3; Figuras A.4.3.1-A.4.3.12). Estos resultados confirman a su vez lo ya reportado previamente con respecto a cómo se acomoda la galactosa, “anclándose” al subsitio C e interactuando mediante enlaces de hidrógeno con los aminoácidos de los subsitios C y D. A su vez se analizó la distancia entre el Trp68 (N $\epsilon$ 1) y O3 de la galactosa, observándose que en promedio era 6 Å y el RMSD < 0.3 Å durante todo el período de simulación evaluado (Anexo 4.3.9 y 4.3.10). Esto es una evidencia de que durante toda la simulación las interacciones hidrofóbicas entre el anillo piranósico y el residuo de Trp se mantuvieron estables <sup>16</sup>. Finalmente, con el objetivo de analizar cómo se modificó la estructura del ligando a lo largo de la simulación, se analizaron los ángulos  $\phi$  y  $\psi$ , que forman el enlace glicosídico. El enlace  $\phi$  se define como el ángulo diedro formado por H1-C1-O4'-C4' y  $\psi$  el formado entre los átomos C1-O4'-C4'-H1' (Figura 4.7). Tal como se puede apreciar en las figuras del anexo A4.3.13-4.3.16, los valores de dichos ángulos diedros se mantuvieron dentro de los valores esperados, usualmente en el entorno de 15° y 52° respectivamente <sup>16</sup>.

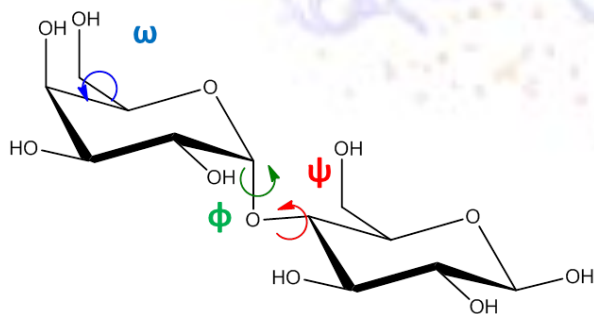


Figura 4.7. Ángulos diedros  $\psi$ ,  $\phi$  y  $\omega$ .

El mismo análisis se llevó a cabo para hGal-3 evaluando las distancias entre los residuos His158 (N $\epsilon$ 2), Arg162 (NH<sub>2</sub>) y el O4 y entre la Asn174 (N $\delta$ 2), y Glu184 (O $\epsilon$ 2) y

el O6 del residuo galactopiranosido de la LacNAc. Las distancias calculadas durante toda la simulación variaron muy poco en todos los casos menos de 0.6 Å. Esto pone de manifiesto nuevamente la presencia de interacciones de tipo enlace de hidrógeno entre dichos átomos. A su vez se analizó la variación de la distancia entre el Trp181 (Nε1) y O3 de la galactosa en este caso la distancia promedio fue 5 Å y el RMSD menor a 0.4 Å. Al igual que en el caso de hGal-1, esto demuestra que las interacciones hidrofóbicas entre el anillo piranósico y el residuo de Trp se mantuvieron estables durante toda la simulación. Por último se evaluó la variación de los ángulos diedros H1-C1-O4'-C4' y  $\psi$  el formado entre los átomos C1-O4'-C4'-H1' durante toda la trayectoria (Anexo A4.4). En general, se observa que durante los primeros 1500 ps de la trayectoria tanto las distancias como los ángulos  $\phi$  y  $\psi$ , fluctúan levemente estabilizándose posteriormente. El RMSD de las distancias medidas en todos los casos fue menor a 0.5 Å y en el caso de los ángulos diedros no superó 0.1 Å.

#### **4.2.2.2. Dinámica molecular de hGal-1 y hGal-3 empleando GROMACS.**

Dada la importancia del tiempo en una simulación de DM se realizaron simulaciones durante tiempos más prolongados (200ns), y en ausencia de ligando. Estas simulaciones de DM se realizaron en GROMACS 5.1<sup>17</sup> empleando el campo de fuerzas GROMOS<sup>6</sup> a partir de las estructuras cristalográficas de hGal-1 (pdb ID: 1GZW) y hGal-3 (pdb ID: 3ZSJ).

##### Dinámica Molecular de hGal-1

Previo a la simulación, se modificó en el archivo del PDB original el residuo Cys16, que en la estructura cristalográfica se encuentra oxidado (CSO16Cys) y se quitó el ligando co-cristalizado en la estructura. Se obtuvo una trayectoria de 200 ns y se realizó el análisis del RMSD de los C $\alpha$  (Figura 4.8). La misma muestra que el RMSD no varía sustancialmente, no superando los 0.2 Å en ningún momento, evidenciando una estructura estabilizada a lo largo de la trayectoria.



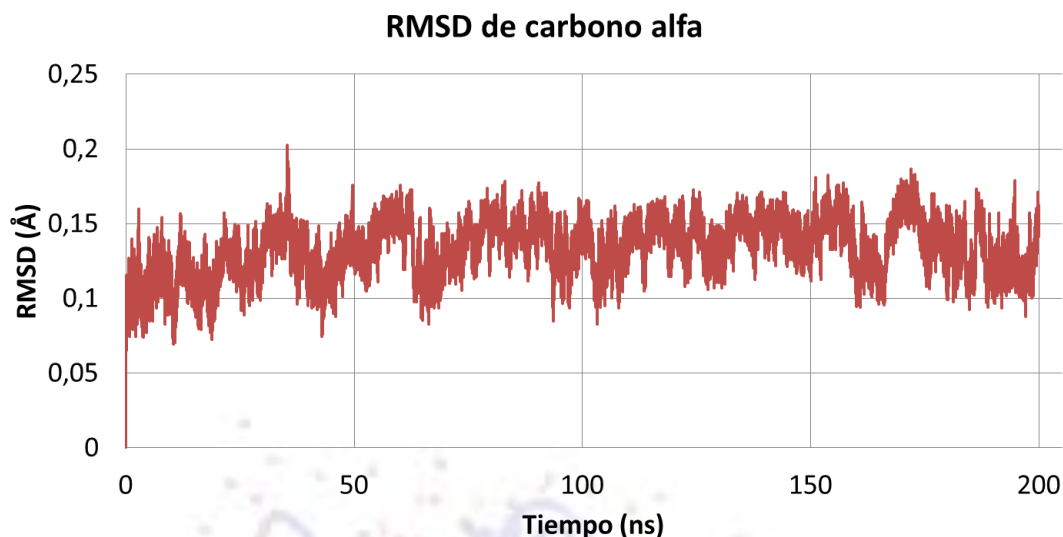


Figura 4.8. Evaluación del RMSD de carbono  $\alpha$  a lo largo de la trayectoria

A partir de estos resultados se realizó un análisis de cluster con el objetivo de obtener estructuras representativas para los estudios de docking posteriores.

#### Análisis de cluster para hGal-1

Para realizar el análisis de cluster originalmente se toman los últimos 20 ns de la trayectoria, obteniéndose solo 2 clusters. Se considera que es un número pequeño de clusters por lo que se amplió el análisis. Posteriormente se tomaron en cuenta los últimos 50 ns de la trayectoria de la DM y un cut-off de 0.15 Å. En estas condiciones, se obtuvieron 8 clusters, lo que representa un número aceptable. El cluster 1 representa el 82 % de la población, por lo que se considera que la estructura correspondiente es representativa del sistema. Los siguientes clusters 2 y 3 representan el 13 % y 4 % de las estructuras obtenidas, respectivamente. De los ocho clusters obtenidos, los primeros tres representan el 99 % de la población. En la Figura 4.9 se muestra el tamaño de cada cluster, es decir la cantidad de estructuras que componen cada uno.

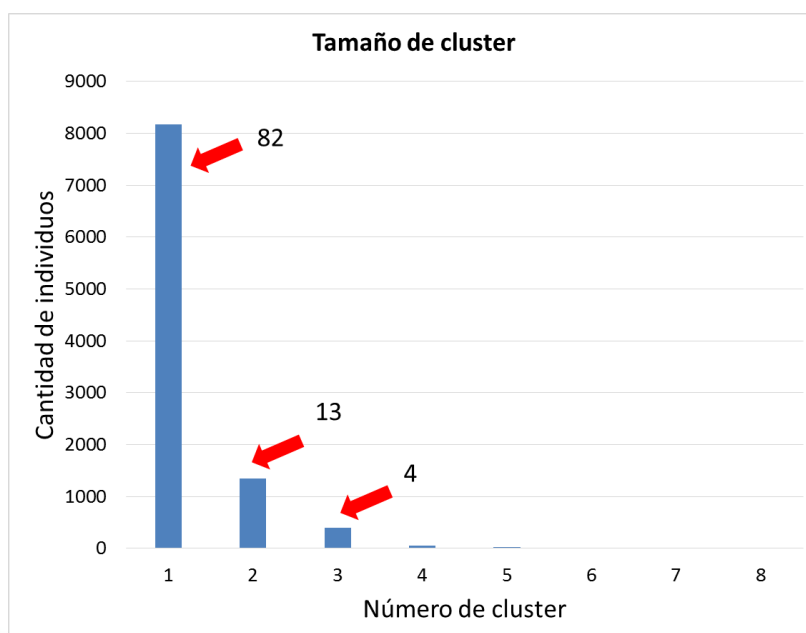


Figura 4.9. Análisis de cluster para hGal-1

Se analizó el RMSD entre las estructuras promedio de los distintos clusters. Este valor no supera 1.7 Å en ningún caso (Figura 4.10A), indicando gran similitud entre los ocho modelos obtenidos. Esto se ve reflejado al superponer las ocho estructuras de los mismos (Figura 4.10B) observándose que son todas muy similares. Las mayores variaciones se observan en los extremos terminales de las cadenas y en los loops flexibles. Todas estas regiones de mayor variación son las más móviles, y se encuentran alejadas del sitio activo.

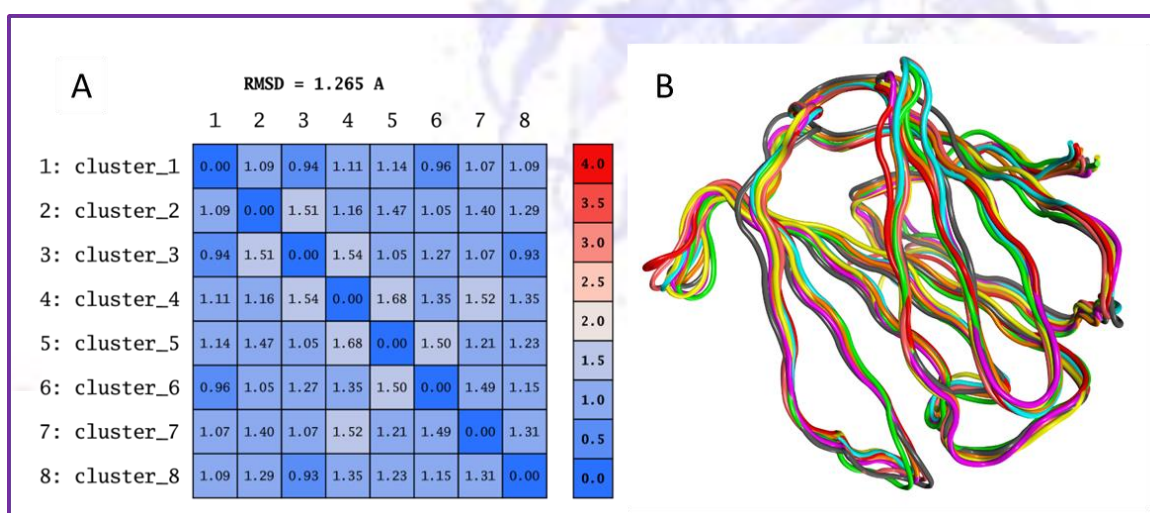


Figura 4.10. A) Análisis de RMSD entre las estructuras de los ocho cluster obtenidos; B) Superposición de las estructuras correspondientes a los 8 clusters obtenidos

Por otro lado, con el objetivo de observar las principales diferencias entre la proteína cristalizada y la obtenida a partir de los cálculos, se superpuso la estructura cristalizada (PDB id 1GZW) y la correspondiente al cluster 1 (Figura 4.11). En este caso particular, se observan las principales diferencias en los residuos Ala1, Cys2, His52, Ala75, Gly124, Phe133 y Asp134. En particular el residuo de His52 pertenece al subsitio C del DRC, e interacciona principalmente con el residuo de glucosa de la lactosa. Esto puede indicar que la estructura cristalográfica no es representativa de lo que pasa en disolución, lo cual es particularmente importante para estudios de actividad biológica (los que se realizan en disolución). Estos resultados demuestran la importancia de procesar las estructuras cristalográficas, previo al desarrollo de otros cálculos.

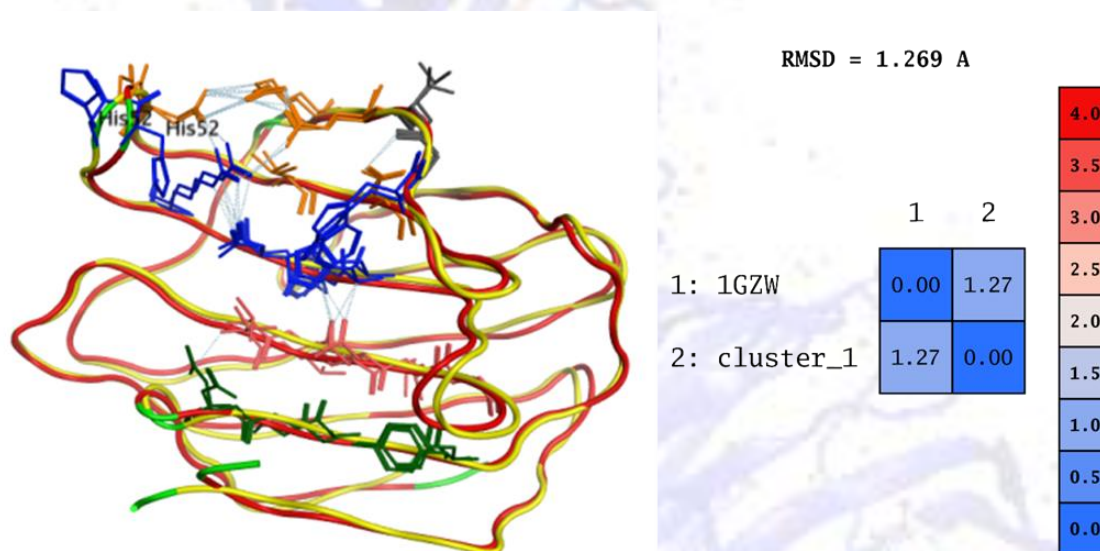


Figura 4.11. Superposición de las estructuras cristalográficas de la hGal-1 (pdb ID: 1GZW) y el cluster 1 y análisis de RMSD.

En función de lo anterior, se decide utilizar el cluster 1 para los posteriores estudios de docking molecular.

### Dinámica molecular de hGal-3

Al igual que en el caso de hGal-1, se realizó una simulación de 200 ns. A partir de la trayectoria de 200 ns se realizó el análisis del RMSD de los C $\alpha$  (Figura 4.12). La misma muestra que dicho RMSD no varía sustancialmente, no superando los 0.15 Å en ningún momento, y mostrando que la estructura alcanza el equilibrio.

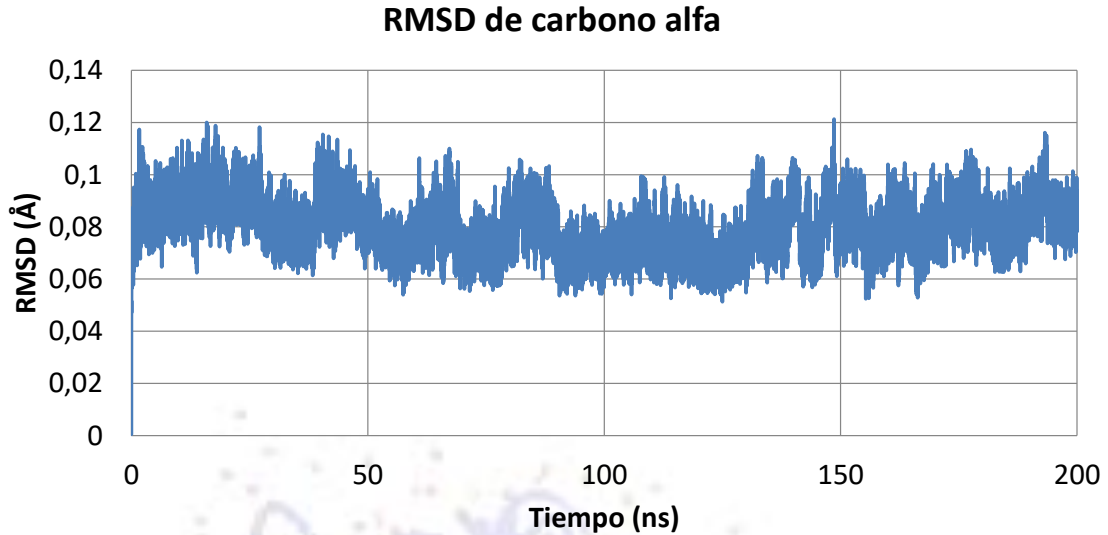


Figura 4.12. Evaluación del RMSD de carbono  $\alpha$  a lo largo de la trayectoria

#### Análisis de cluster para hGal-3

Al igual que en caso de hGal-1 se tomaron los últimos 50 ns de la trayectoria para realizar un análisis de cluster con un cut-off de 0.15 Å. A partir de dicho análisis se obtuvieron 17 clusters (Figura 4.13).

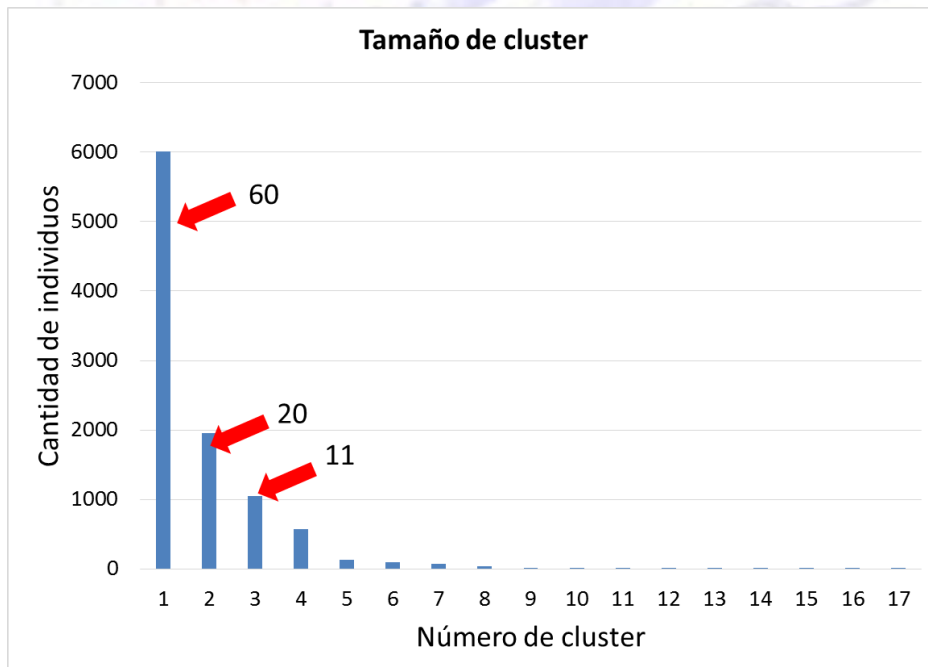


Figura 4.13. Análisis de cluster para hGal-3

Como se puede apreciar en la figura 4.13, el cluster 1 involucra el 60 % de la población, por lo que se considera una buena representación del sistema. El siguiente cluster corresponde al 20% y el tercero al 11%. Por lo cual estos tres últimos, involucran el 91 % de la población total analizada.

Se compararon todos los clusters obtenidos, obteniéndose un RMSD promedio menor a 1 Å y en ningún caso diferencias mayores a 1.3 Å entre clusters. Nuevamente esto se refleja cuando se observa la superposición de los clusters (Figura 4.14). En este caso también las mayores variaciones se encuentran en los extremos terminales, lejos del sitio activo, por lo que el mismo se encuentra bien representado en todos los clusters seleccionados.

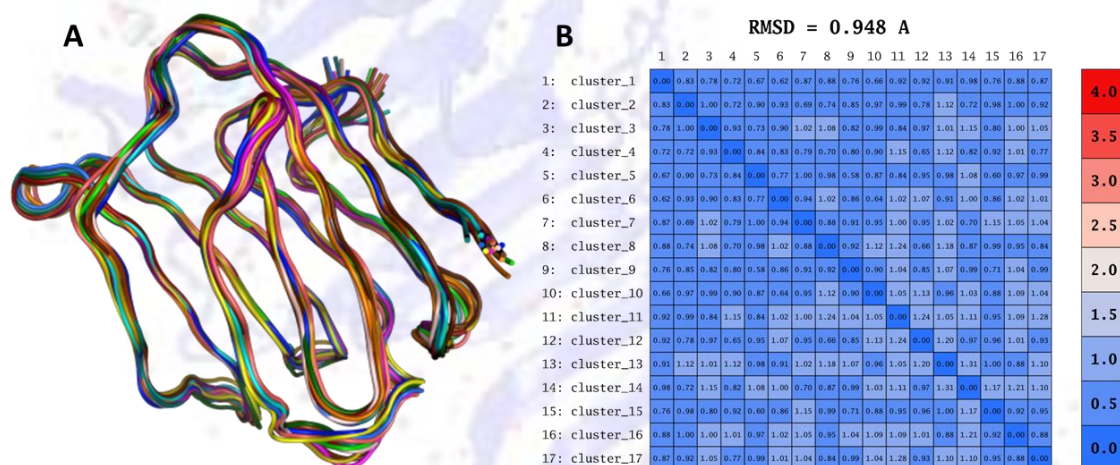
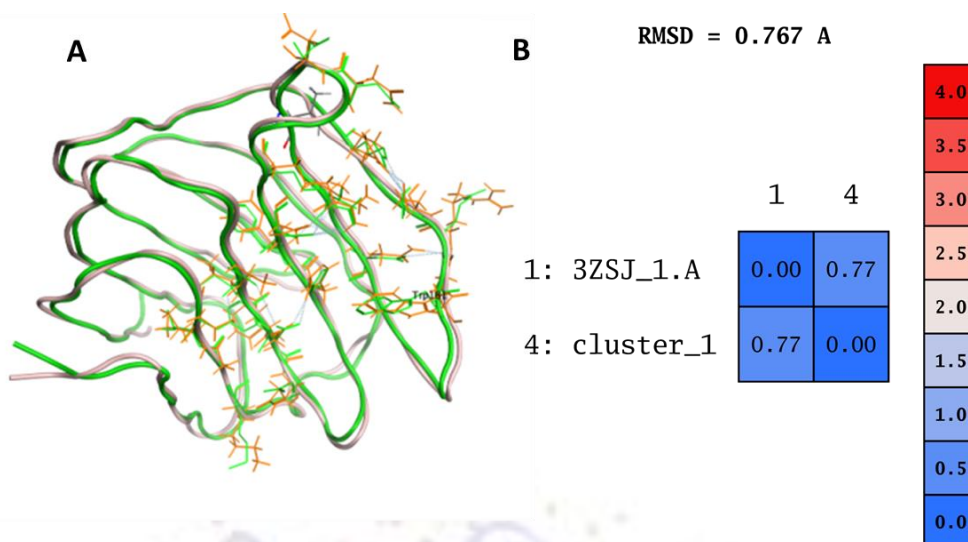


Figura 4.14. A) Análisis de RMSD entre las estructuras de los 17 cluster obtenidos; B) Superposición de las estructuras correspondientes a los 17 clusters obtenidos

Finalmente se superpuso el cluster mayoritario (cluster 1) con la estructura cristalográfica (pdbID: 3ZSJ). Tal como se puede apreciar en la figura 4.15, la diferencia entre ambas es 0.8 Å, lo que indica mucha similitud entre ambas. Si se observan los DRC superpuestos (Figura 4.15), la mayor diferencia se ve en el subsitio C a nivel del Trp181. Nuevamente se pone de manifiesto, la importancia de realizar los experimentos de docking sobre la estructura relajada, y no utilizar directamente la cristalizada.



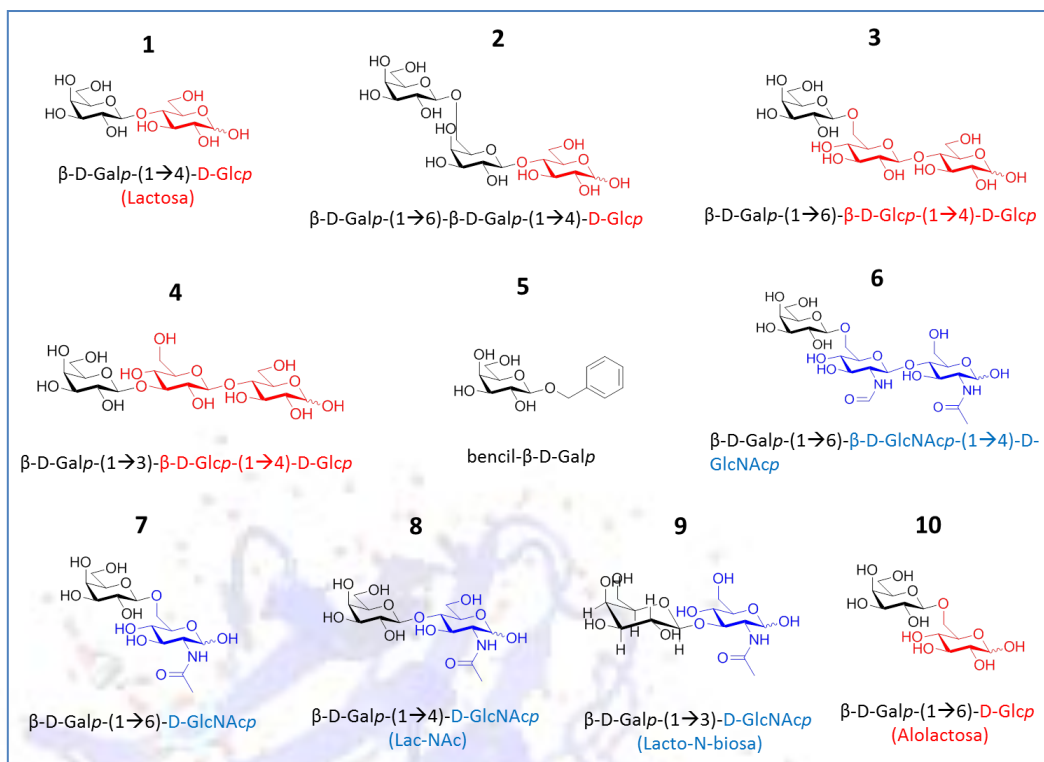
**Figura 4.15.** Superposición de las estructuras cristalográficas de la hGal-3 (pdb ID: 3ZSJ) y el cluster 1 y análisis de RMSD.

En función de esta simulación, se toma el cluster 1 como estructura de partida para los estudios posteriores de docking.

### 4.2.3. Generación de modelos tridimensionales de los ligandos

#### 4.2.3.1. Generación de los ligandos usando MOE

Se generaron las estructuras representativas de los trisacáridos sintetizados en el capítulo anterior, así como una serie de disacáridos de origen comercial (Esquema 4.2). Se construyeron varias conformaciones de cada uno de ellos incluyendo los dos anómeros en el caso de los di y trisacáridos teniendo en cuenta que en disolución coexisten ambas especies<sup>18</sup>. Para ello se utilizó la herramienta Carbohydrate Builder provista por el software Molecular Operating Environment (MOE, 2011.10)<sup>12</sup>. Las estructuras de los ligandos fueron estabilizadas mediante DM, previa etapa de minimización con un gradiente de 0.001 kcal/mol. Dicho procesamiento se realizó usando el algoritmo NPA (Nose-Poincare-Andresen)<sup>19</sup> y un campo de fuerzas PEF95SAC<sup>20</sup> (adecuado para carbohidratos). La simulación de DM se llevó a cabo durante 500 ps a 300 K.



Esquema 4.2. Estructura de los ligandos propuestos

Mediante las simulaciones de DM se obtuvieron una serie de estructuras cuya energía se mantiene estable durante toda la simulación. En la Figura 4.16 se muestran los resultados de variación de energía potencial a lo largo de la trayectoria para el  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranososa (**3**), siendo los resultados análogos para el resto de los compuestos.

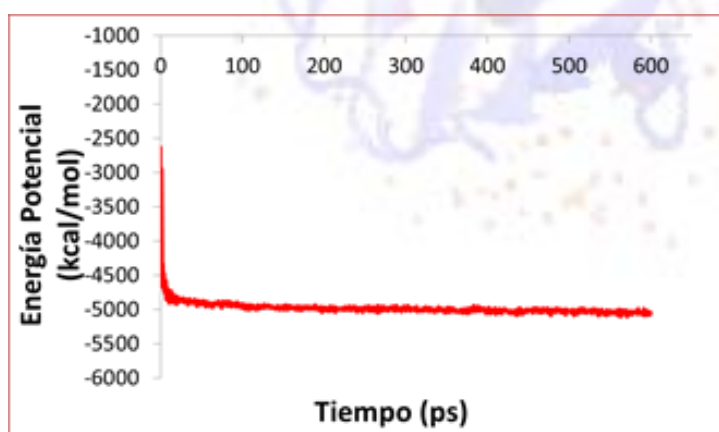


Figura 4.16. Variación de la energía potencial a lo largo de la trayectoria de dinámica molecular para  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranososa (**3**).

En base a un examen detallado de estas conformaciones, se seleccionaron aquellas cuya energía se presentaba en el rango de estabilidad y con una estructura razonable y adecuada para seguir adelante con los estudios de interacción.

#### 4.2.3.2. Generación de los ligandos usando Glycam <sup>21</sup>.

Se utilizó una segunda estrategia para la generación de los ligandos propuestos utilizando la herramienta *Carbohydrate Builder* de la plataforma <http://glycam.org> <sup>21</sup>. Esta plataforma, creada por Robert Woods y colaboradores <sup>22</sup>, permite generar carbohidratos “online” y minimizar su energía mediante el campo de fuerzas *Glycam06*, el cual está parametrizado de forma de tener en cuenta la flexibilidad y ángulos de enlace glicosídicos <sup>1,23,24</sup>. Una vez minimizados son descargados de dicha plataforma en formato pdb. Para los compuestos en los que el enlace glicosídico entre la galactosa terminal y el siguiente azúcar es  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) se obtienen las conformaciones más estables, gauche-gauche ( $-60^\circ$ ) y gauche-trans ( $+60^\circ$ ) respectivamente, con respecto al diedro O-C6-C5-O5, siendo O, el oxígeno involucrado en dicho enlace (Figura 4.17).

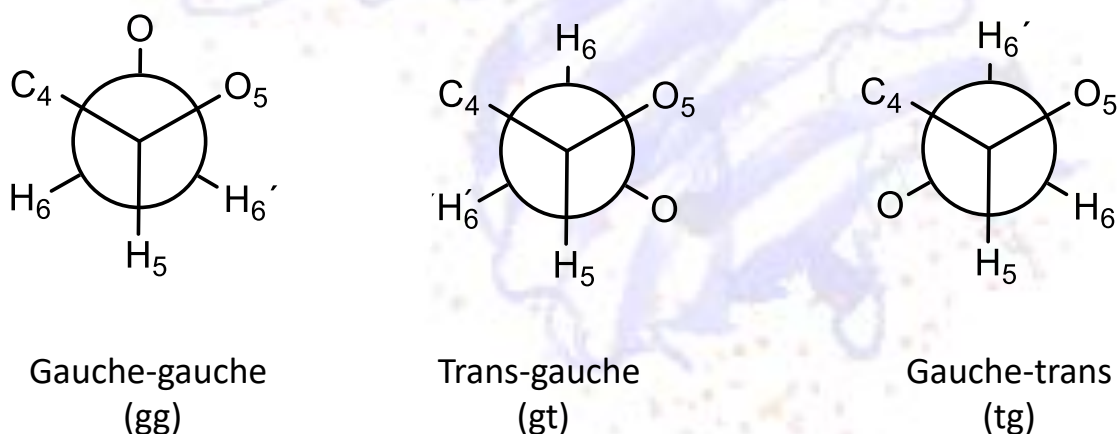


Figura 4.17. Conformaciones posibles respecto al diedro O-C6-C5-O5

#### 4.2.4. Docking molecular

Uno de los objetivos de esta tesis es el desarrollo de un modelo teórico capaz de predecir la afinidad entre la galectina y un ligando. Para poner a punto dicho modelo se realizaron distintos experimentos de docking molecular entre las hGal-1 y hGal-3, y



los ligandos obtenidos experimentalmente al igual que los comerciales que se tomaron como referencia.

Tal como se demostró en las simulaciones de DM que se realizaron previamente, sería aconsejable realizar los experimentos de docking molecular a partir de las estructuras relajadas de hGal-1 y hGal-3 obtenidas previamente. Sin embargo, estos experimentos fueron realizados antes de poder llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular. Por tanto, en el caso de hGal-1, no se utilizó la estructura cristalográfica de la galectina, preparada y minimizada. En este caso se seleccionó la estructura pdbID: 4Q26. Adicionalmente, los resultados presentados aquí se corresponden con los publicados en nuestro artículo de 2019 y los mismos se ajustan razonablemente a los datos experimentales. Por tanto, en esa sección se presentan los resultados de docking empleando la estructura cristalográfica de hGal-1. En el caso de hGal-3, los estudios de docking se realizaron a partir del cluster 1 obtenido en la simulación de DM realizada en GROMACS.

Se realizaron dos tipos distintos de docking molecular, para ello se utilizaron los programas Schrödinger (Maestro) 2015. v2 <sup>25</sup> y AUTODOCK 4.2 <sup>26</sup>. Los mismos se diferencian en sus métodos de posicionamiento y score. Mientras que AUTODOCK utiliza el método de *placement* Algoritmo Genético <sup>27</sup> y de score basado en campo de fuerzas, Schrödinger utiliza método de score basado en conocimiento (GLIDE) <sup>8,27-29</sup>.

Una vez finalizados los métodos de docking se estimó la energía libre de unión de la mejor pose obtenida. Para ello se utilizó la función de scoring GBVI/WSA (Generalized Born Volume Integral) dG <sup>30,31</sup>, provista por el software MOE. Esta función es un método de scoring basado en campo de fuerzas que es capaz de estimar la energía de unión de una determinada pose obtenida en un experimento de docking <sup>28,31</sup>.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta, independientemente de cual programa se utilice, es el estado de protonación de los residuos de histidina que forman la proteína y en particular, las que se encuentran en el DRC, formando parte de la interacción galectina-carbohidrato. Durante la preparación de la proteína, la protonación se asigna automáticamente y se debe verificar ya que a veces no resulta correcta. A pH 7.0- 7.4 la histidina debería ser neutra (pKa: 6.6) <sup>32</sup>. Es muy importante

el ajuste de este parámetro, ya que la His44 (para hGal-1) y la His158 (para hGal-3), están directamente involucradas con la unión de la galactosa al residuo C, y su carga neta positiva, hace que dicho anclaje no sea posible<sup>32,33</sup>. En AUTODOCK la protonación se ajustó manualmente.

#### **4.2.4.1. Docking utilizando el programa AUTODOCK**

Al igual que en otros programas, para emplear AUTODOCK 4.2 tanto el ligando como la proteína deben ser preparados, es decir, a partir de la estructura cristalográfica (hGal-1) o la obtenida previamente en la DM (hGal-3), se debe protonar la proteína, asignar la carga correspondiente a cada átomo, definir los tipos de átomos, información topológica (enlaces que rotan, etc.). Esa nueva información se suma al archivo de tipo *pdb* generando un nuevo archivo de tipo *pdqt*. La generación de estos archivos de coordenadas se realizó en Autodock Tools<sup>26,34</sup> (ADT), una interfase gráfica que permite la preparación tanto de los ligandos como la proteína, así como la generación de los archivos correspondientes a la grilla y los parámetros característicos del experimento. La grilla seleccionada para estos experimentos se centró en el N $\epsilon$  del residuo Trp68 con un tamaño 46 x 40 x 50 con un espacio entre puntos de 0.375 Å (hGal-1), o Trp181 con un tamaño de 46 x 46 x 46 puntos con un espacio entre puntos de 0.375 Å (hGal-3). Una vez realizado el docking, se analizaron los clusters generados y se seleccionaron aquellos en los que la galactosa se encuentra en el subsitio C (Tabla 4.1; poses seleccionadas en Anexo 4.5). El valor de energía obtenido en el score de AUTODOCK, es orientativo, pero no comparable con valores experimentales por lo que se realizó una minimización posterior de la energía de unión galectina ligando a través de MOE mediante la herramienta *LigX*, aplicando el campo de fuerzas AMBER99.

Tabla 4.1. Resultados de docking en AUTODOCK

hGal-1			
Ligando	Score (kcal/mol)	Cluster	Energía de unión (kcal/mol) MOE*
1	-4.10	2	-5.35
2	-2.75	2	-5.44
3	-2.79	1	-5.37
4	-2.02	1	-5.18
5	-3.72	1	-4.95
6	-3.01	1	-4.29
7	-3.28	9	-5.15
8	-3.95	1	-6.69
9	-3.47	1	-5.93
10	-3.03	1	-4.58
hGal-3			
1	-1.99	1	-5.44
2	-0.18	3	-6.11
3	-1.89	5	-5.61
4	-0.06	9**	-5.07
5	-3.13	1	-4.67
6	-0.69	12**	-5.62
7	-3.17	2**	-4.16
8	-1.17	25	-5.13
9	-2.05	6	-4.34
10	-2.29	9	-4.96

\*Campo de fuerzas aplicado AMBER99gradiente 0.001 kcal/mol

\*\* No logran ajustarse a las interacciones de tipo enlace de hidrógeno

\*\*\* Media ponderada

*LigX* es una herramienta de MOE, formada por una colección de procedimientos y capacidades para realizar modificaciones interactivas de ligandos y minimización de energía en el sitio activo de un receptor flexible. Cuando se aplica esta herramienta, el receptor queda fijo, a excepción de los aminoácidos que se encuentran en un radio de 8 Å alrededor del ligando (estos quedan flexibles lo que les permite moverse). Mientras tanto, los átomos del ligando se pueden configurar con libertad de movimiento o aplicar restricciones.

Cabe destacar que las energías de unión de los compuestos **3** y **4** con las galectinas se calcularon en forma independiente, pero se realizó el promedio ponderado teniendo

en cuenta su proporción en la mezcla de isómeros obtenida en forma experimental (65:35), de acuerdo a lo descrito en el capítulo 3.

Las imágenes de las poses seleccionadas en los experimentos con hGal-1 se pueden apreciar en el Anexo 4 (Figuras A.4.5.1.1- A.4.5.1.10). Los ligandos **8** y **9** (LacNAc y lacto-*N*-biosa) son los que presentan menor energía lo cual es coherente con lo reportado previamente. Le siguen los trisacáridos **2** y **3** seguidos de lactosa (ligando **1**) y luego los demás compuestos. Si bien se observa una leve tendencia, es claro que las diferencias entre las energías estimadas son muy pequeñas. Dichas energías de unión, de algunos de los ligandos ensayados, como lactosa o LacNAc, son similares a las obtenidas experimentalmente por Dam y colaboradores<sup>35</sup> mediante estudios de interacción por titulación calorimétrica isotérmica (ITC). Esta coincidencia, validaría parcialmente los resultados<sup>36,37</sup>. Con excepción del ligando **7**, el primer o segundo cluster obtenido en el experimento de docking presentaron la pose adecuada.

En cuanto a las poses observadas, se obtuvieron para todos los ligandos estudiados, poses que representaron las interacciones características entre la galactosa terminal y los residuos His44, Arg48 y el O4, Glu71 Asn61 y O6 y entre el Trp68 y la cara B de dicho residuo galactopiranosídico.

En cuanto a hGal-3, el ligando **1** (lactosa) aparenta tener una menor energía de unión (mayor afinidad) que los ligandos **8** y **9**. Este hecho, no está en sintonía con lo reportado previamente por Bachhawat-Sikder y colaboradores<sup>35</sup> donde ocurre lo contrario. Se suma, el hecho de que en el caso de los ligandos **4**, **6** y **7** no se logró obtener una pose que reprodujera las interacciones entre el subsitio C de la galectina y el residuo de galactosa no reductor. Estos resultados muestran que estos experimentos de docking con AUTODOCK no logran reproducir las interacciones características reportadas en el caso de hGal-3. Las poses seleccionadas se pueden apreciar en el Anexo 4 (Figuras A. 4.5.2.1-4.5.2.10).

#### **4.2.4.2. Docking utilizando el programa GLIDE (Schrödinger)**

Los mismos ligandos que fueron evaluados empleando AUTODOCK se sometieron a un nuevo experimento de docking utilizando en este caso GLIDE, perteneciente al

programa Schrodinger <sup>28,38</sup>. La metodología para el docking seleccionado fue mediante un modelo de ajuste inducido. La grilla se centró en las coordenadas correspondientes al O del enlace glicosídico del ligando coordinado en la estructura cristalográfica original. Las energías obtenidas para las poses seleccionadas se resumen en la Tabla 4.2 y se muestran en el Anexo 4 (Figuras A.4.6.1.1 – A.4.6.2.10). En Schrödinger se utilizó el algoritmo de docking GLIDE (Grid based Ligand Docking with Energetics). Se empleó Glide XP (extra-precision), dicho método posee un elevado grado de precisión en el método de posicionamiento y búsquedas conformacionales, así como funciones de score cada vez más estrictas. En todos los casos se realizó una minimización de los ligandos post- docking y se conservó una única pose por ligando. Se empleó OPLS\_2005 como campo de fuerzas de trabajo.

Tabla 4.2. Resultados de docking empleando GLIDE

	<b>Ligando</b>	<b>IFD Score(kcal/mol)</b>	<b>IFDScore (kcal/mol)</b>	<b>Energía de unión (kcal/mol) MOE*</b>	
<b>hGal-1</b>	<b>1</b>	-311.705	-311.705	-9.04	
	<b>2</b>	-308.187	-308.187	-7.94	
	<b>3+4</b>	-307.679 (3)	-308.291	-7.78	-7.88**
		-309.457 (4)		-8.03	
	<b>5</b>	-305.085	-305.085	-6.19	
	<b>6</b>	-309.127	-309.127	-6.40	
	<b>7</b>	-308.107	-308.107	-5.56	
	<b>8</b>	-309.270	-309.270	-6.21	
	<b>9</b>	-309.953	-309.953	-6.20	
	<b>10</b>	-307.804	-307.804	-6.40	
<b>hGal-3</b>	<b>1</b>	-319.405	-319.405	-9.49	
	<b>2</b>	-314.189	-314.189	-6.36	
	<b>3 +4</b>	-317.598 (3)	-316.433	-8.13	-7.97**
		-314.685 (4)		-7.73	
	<b>5</b>	-310.412	-310.412	-5.70	
	<b>6</b>	-318.524	-318.524	-8.79	
	<b>7</b>	-317.400	-317.400	-6.83	
	<b>8</b>	-317.924	-317.924	-8.68	
	<b>9</b>	-316.824	-316.824	-7.09	
	<b>10</b>	-316.209	-316.209	-6.66	

\*Campo de fuerzas aplicado AMBER99gradiente 0.001 kcal/mol \*\* Media ponderada

Tal como ocurre utilizando AUTODOCK, (sección 4.2.4.1.), en este caso, las diferencias en las energías de unión obtenidas a partir del IFDScore de este experimento de

docking molecular son muy similares, lo que no permite establecer un orden de afinidad de las galectinas por cada uno de los ligandos.

La energía libre de unión se calculó a partir de la pose seleccionada en el software MOE tal como se describe previamente.

En la Tabla 4.2 se puede apreciar las energías de score obtenidas para hGal-1 y hGal-3. En este caso, si bien se aprecian diferencias entre las energías de score (menos de un 1% en la mayoría de los casos) las mismas no son significativas como para establecer una tendencia absoluta. Las energías de unión estimadas luego de este experimento de docking estuvieron en el entorno del doble de las reportadas para lactosa y LacNAc en la bibliografía consultada <sup>35,36</sup>. Dichas energías de unión estimada por MOE son diferentes. Estas diferencias son razonables y las tendencias son similares a las experimentales.

Sin duda algo muy importante a destacar es que las poses obtenidas utilizando este método demostraron un gran ajuste de acuerdo a lo esperado. En las poses seleccionadas (en general la primera o segunda del ranking de score) para la mayoría de los compuestos se pueden observar las interacciones características entre la galactosa y los aminoácidos del subsitio C como se discutirá en el capítulo 5 (las poses seleccionadas se pueden observar en el Anexo A4.6). Esto no es menor en sistemas tan difíciles de modelar.

### **4.3. DISCUSIÓN**

La obtención de modelos computacionales que logren representar la realidad biológica es siempre un desafío. En particular, los sistemas biológicos que comprenden carbohidratos expuestos al disolvente polar e interactuando con proteínas tienen una dificultad adicional. En esta tesis se lograron superar esos obstáculos y desarrollar modelos capaces de representar las interacciones entre los ligandos propuestos y las galectinas. Se analizaron distintas estrategias metodológicas con el fin de obtener un método capaz de predecir la afinidad de un potencial ligando de dichas proteínas.

Se realizaron dos tipos de simulaciones de DM partiendo de las estructuras cristalizadas de hGal-1 y hGal-3 con el objetivo de evaluar la estabilidad de la

estructura (sola y en coordinación con su ligando cristalizado) y obtener estructuras representativas de lo que sucede en disolución. En el caso de hGal-3, la estructura relajada obtenida a partir del análisis de cluster, fue tomada como punto de partida para los experimentos de docking posteriores. Esto no fue posible para hGal-1 en la que se debió partir finalmente de otra estructura cristalizada (pdbID: 4Q26), que fue preparada adecuadamente y su energía minimizada. Sin embargo, los resultados reproducen muy bien las tendencias y representan las interacciones reportadas entre hGal-1 y los ligandos.

Por otra parte, las simulaciones realizadas en MOE <sup>12</sup>, permitieron evaluar las interacciones entre los aminoácidos del subsitio C y el ligando co-cristalizado en cada caso, las cuales son responsables de la estabilidad del complejo. Este análisis es fundamental, teniendo en cuenta la naturaleza hidrofílica de los ligandos y lo expuesto que está el DRC al disolvente.

Utilizando tanto GLIDE (a través de la interfase gráfica Maestro de Schrödinger) como AUTODOCK se lograron obtener poses donde se confirman las interacciones con los ligandos reportados en bibliografía para hGal-1. En función de lo anterior podemos evaluar que los métodos de posicionamiento (*placement*) utilizados en ambas metodologías, son adecuados para estos sistemas galectina-carbohidrato.

En cuanto a la energía de unión, el método de score que al parecer se ajusta más a lo reportado experimentalmente para hGal-1, fue AUTODOCK. Sin embargo, las diferencias en términos de energías libres de unión son muy pequeñas. Esto también se observa en la bibliografía para los ligandos como lactosa o *N*-acetil-lactosamina, y ciertamente coincide con los resultados obtenidos para el caso de AUTODOCK, validando así el método.

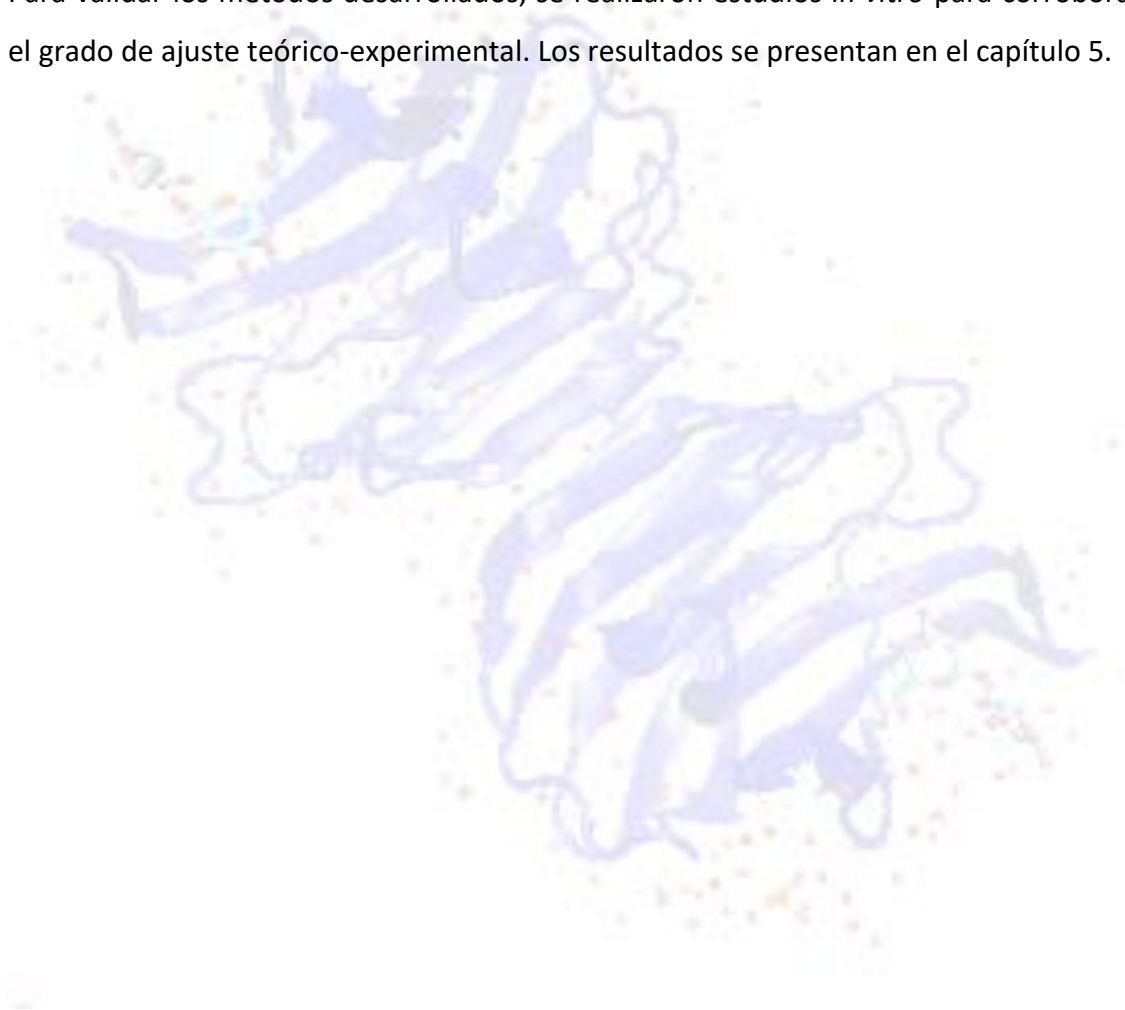
En el caso de hGal-3 no fue posible reproducir las tendencias experimentales con AUTODOCK, en las condiciones estudiadas.

En cuanto a GLIDE, si bien se obtuvieron poses adecuadas, las energías libres de unión obtenidas a partir de dichas poses en MOE, no siempre concuerdan con los resultados experimentales de la bibliografía consultada en el caso de lactosa y *N*-acetil-

lactosamina<sup>36,39</sup>. El método de score en este caso no resulta ser tan eficiente como para poder permitirnos apreciar un orden de afinidad.

Una cosa importante a tener en cuenta es que estos modelos, tanto al realizar un estudio de docking como en una simulación de DM, es que se tienen en cuenta solo un campo de fuerzas para proteínas (ej. AMBER) y/o moléculas pequeñas (OPLS) orgánicas. Esto hace que no necesariamente la parametrización de los carbohidratos sea del todo ajustada.

Para validar los métodos desarrollados, se realizaron estudios *in vitro* para corroborar el grado de ajuste teórico-experimental. Los resultados se presentan en el capítulo 5.

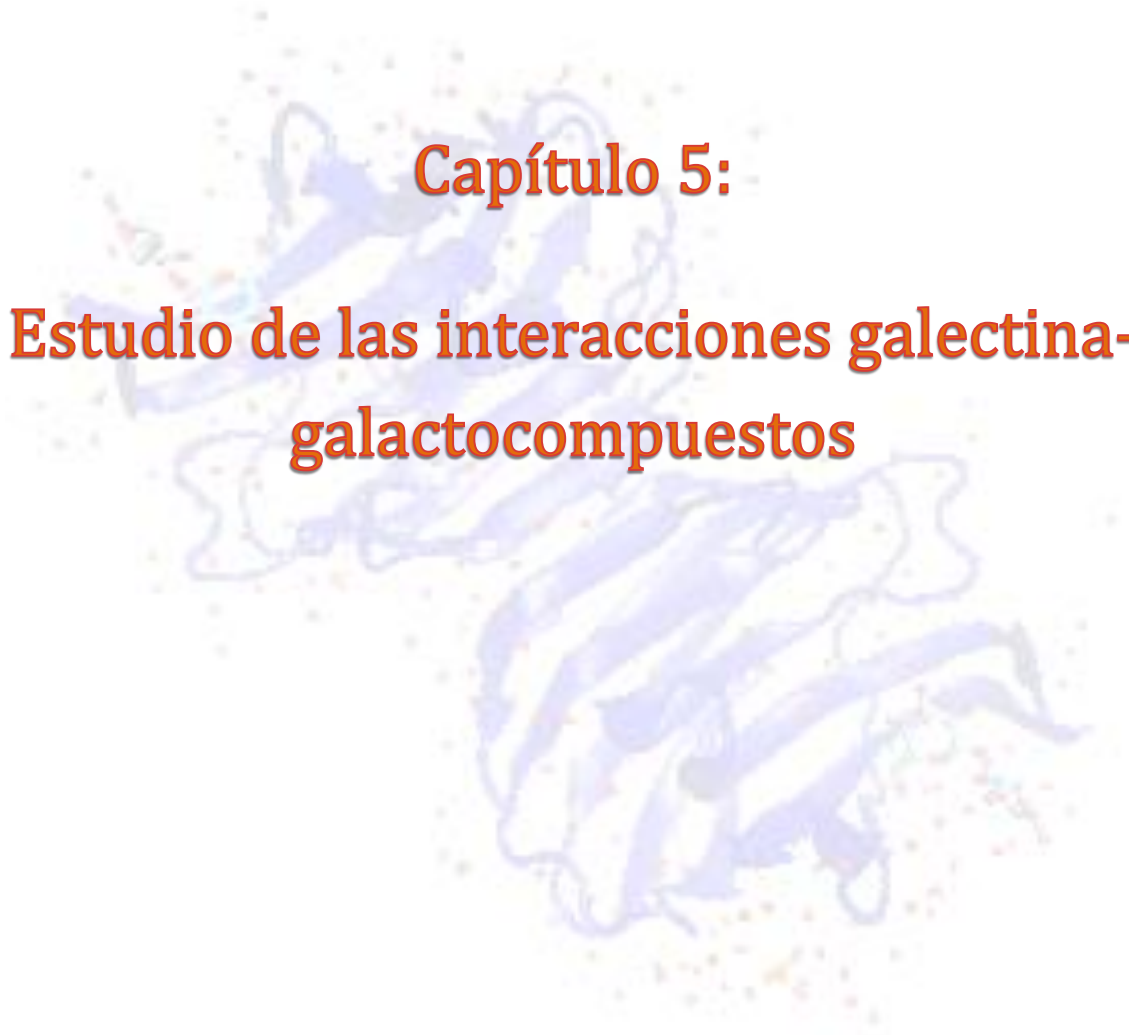




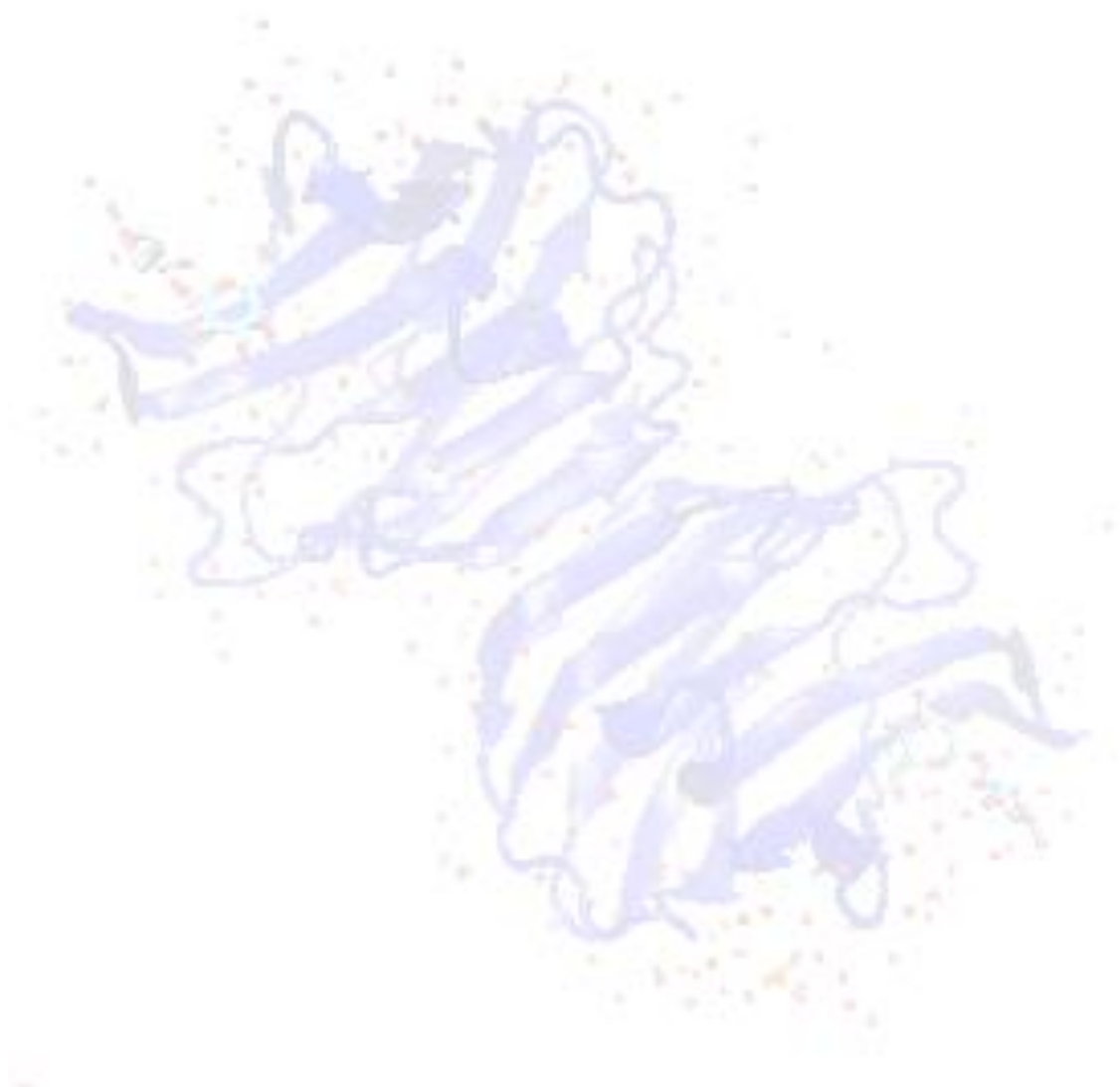
#### 4.4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Fadda, E.; Woods, R. J. *Drug Discov. Today* **2014**, *15* (0), 596–609.
- (2) Lacetera, A.; Berbís, A.; Nurisso, A.; Jimenez-Barbero, J.; Martín-Santamaría, S. In *Computational Tools for Chemical Biology*; 2018; pp 145–162.
- (3) Aoki-kinoshita, K. F. **2008**, *4* (5), 1–7.
- (4) Meynier, C.; Feracci, M.; Espeli, M.; Chaspoul, F.; Gallice, P.; Schiff, C.; Guerlesquin, F.; Roche, P. *Biophys. J.* **2009**, *97* (12), 3168–3177.
- (5) Meynier, C.; Guerlesquin, F.; Roche, P. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2009**, *27* (1), 49–57.
- (6) Genheden, S.; Reymer, A.; Saenz-Méndez, P.; Eriksson, L. a. In *Computational Tools for Chemical Biology*; 2018; pp 1–38.
- (7) Woods, R. J.; Tessier, M. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 575–583.
- (8) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935–949.
- (9) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *65*, 15–26.
- (10) Carter, J. W.; Tascini, S.; Seddon, J. M.; Bresme, F. In *Computational Tools for Chemical Biology*; 2018; pp 39–68.
- (11) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242.
- (12) Molecular Operating Environment, M. 2011.
- (13) López-Lucendo, M. F.; Solís, D.; André, S.; Hirabayashi, J.; Kasai, K. I.; Kaltner, H.; Gabius, H. J.; Romero, A. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343* (4), 957–970.
- (14) Saraboji, K.; Hakansson, M.; Genheden, S.; Diehl, C.; Qvist, J.; Weininger, U.; Nilsson, U. J.; Leffler, H.; Ryde, U.; Akke, M.; Logan, D. T. *Biochemistry* **2012**, *51* (1), 296–306.
- (15) Seetharaman, J.; Kanigsberg, A.; Slaaby, R.; Leffler, H.; Barondes, S. H.; Rini, J. M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (21), 13047–13052.
- (16) Ford, M.; Weimar, T.; Köhli, T.; Woods, R. J. *Proteins* **2003**, *53* (2), 229–240.
- (17) James, M.; Murtola, T.; Schulz, R.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. *Softw. X* **2015**, *1*, 19–25.
- (18) Tanaka, S.; Tsenkova, R.; Yasui, M. *Carbohydr. Res.* **2018**, *463* (March), 40–46.
- (19) Sturgeon, J. B.; Laird, B. B. *J. Chem. Phys.* **2018**, *1*, 1–7.

- (20) Fabricius, J.; Engelsen, S. B.; Rasmussen, K. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16* (6), 751–772.
- (21) Woods Group. GLYCAM Web <http://glycam.org> (accessed Oct 18, 2019).
- (22) Kirschner, K.; Yongye, A.; Tschampel, S.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2015**, *29* (4), 622–655.
- (23) Nivedha, A. K.; Makeneni, S.; Foley, B. L.; Tessier, M. B.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2015**, *35* (7), 526–539.
- (24) Kirschner, K. N.; Woods, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (19), 10541–10545.
- (25) Maestro, S. 2015.
- (26) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.;Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, *30* (16), 2785–2791.
- (27) McCall, J. *J. Comput. Appl. Math.* **2005**, *184* (1), 205–222.
- (28) Wang, Z.; Sun, H.; Yao, X.; Li, D.; Xu, L.; Li, Y.; Tian, S.; Hou, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (18), 12964–12975.
- (29) Forli, S.; Huey, R.; Pique, M. E.; Sanner, M.; Goodsell, D. S.; Arthur, J. **2016**, *11* (5), 905–919.
- (30) Wojciechowski, M.; Lesyng, B. *J. Phys. Chem. B* **2004**, No. 3, 18368–18376.
- (31) Galli, C. L.; Sensi, C.; Fumagalli, A.; Parravicini, C.; Marinovich, M.; Eberini, I. *PLoS One* **2014**, *9* (8), 1–13.
- (32) Hiramatsu, H.; Takeuchi, K.; Takeuchi, H. *Biochemistry* **2013**, *52*, 2371–2380.
- (33) Hiramatsu, H.; Takeuchi, K.; Fukuda, K.; Nishino, T. *Chem. Phys.* **2013**, *419*, 113–117.
- (34) Seeliger, D.; de Groot, B. L. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24* (5), 417–422.
- (35) Bachhawat-Sikder, K.; Thomas, C. J.; Surolia, A. *FEBS Lett.* **2001**, *500* (1–2), 75–79.
- (36) Brewer, C. F. *Glycoconj. J.* **2004**, *19* (7–9), 459–465.
- (37) Cagnoni, A. J.; Kovensky, J.; Uhrig, M. L. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (14), 6456–6467.
- (38) Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 534–553.
- (39) Echeverria, I.; Mario Amzel, L. *Biophys. J.* **2011**, *100* (9), 2283–2292.



**Capítulo 5:**  
**Estudio de las interacciones galectina-  
galactocompuestos**



## 5.1. INTRODUCCIÓN

La interacción de los glicanos celulares con lectinas puede desencadenar o alterar distintos procesos biológicos incluyendo homeostasis celular y señalización vascular, entre otros. Estos mecanismos son dependientes de la estructura del glicano <sup>1-3</sup>. Dentro de las familias de las lectinas, las galectinas son probablemente las más conservadas y ubicuas en el reino animal. Las mismas comparten una secuencia conservada en el Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos (DRC), que muestran afinidad por  $\beta$ -galactósidos, usualmente bajo la forma de *N*-acetil-lactosamina (LacNAc) <sup>2,4,5</sup>. Sin embargo, distintos miembros de la familia de galectinas, presentan afinidades dispares por distintos  $\beta$ -galactósidos. Existen evidencias tanto teóricas como experimentales que indican que la galactosa por sí sola es un ligando de baja afinidad mientras que la misma aumenta para el caso de los disacáridos <sup>6</sup>. Por lo cual, uno de los objetivos de esta tesis fue la síntesis de galactocompuestos con estructuras diversas de forma de evaluar la influencia de la estructura del glicano en la afinidad por las galectinas. Dentro de las galectinas, la -1 y la -3 han sido las más estudiadas, debido a su relevancia tanto a nivel de regulación de la respuesta inmune como del desarrollo tumoral.

Como ya fue descrito en la introducción, galectina-1 (Gal-1) es una galectina prototipo que puede encontrarse tanto en forma monomérica como dimérica <sup>7</sup>. Por otra parte, la galectina-3 (Gal-3) es una galectina de tipo quimera <sup>7</sup>. Ambas poseen un DRC por cada monómero que está conformado por cinco subsitios (A-E) <sup>8,9</sup>. El subsitio C se encuentra altamente conservado en todas las galectinas, y es el sitio de anclaje del residuo  $\beta$ -galactopiranosico, mientras que el subsitio D interacciona con el azúcar unido al carbono anomérico de la galactosa anclada al subsitio C. Tanto Gal-1 como Gal-3 contienen un residuo de triptófano (Trp68 y Trp181 respectivamente) que establece interacciones hidrofóbicas  $\pi$ -H entre el anillo aromático del triptófano y los grupos CH del esqueleto carbonado de la galactosa, preferentemente en su conformación silla <sup>10</sup>. Esta interacción juega un rol primordial en el anclaje del residuo de galactosa. A su vez se establecen una serie de enlaces de hidrógeno específicos entre los hidroxilos polares del carbohidrato y los residuos aminoácidos polares pertenecientes a los subsitios C y D. Las principales interacciones se dan entre el O4 de la galactosa y los

residuos aminoacídicos His44 y Arg48 de Gal-1, y la His158 y Arg162 de Gal-3<sup>11,12</sup>. Gal-3, a su vez presenta interacciones entre el O6 o el O3 (dependiendo del tipo de enlace entre los azúcares y de la identidad de los mismos) del azúcar adyacente a la galactosa con el residuo Glu184 del DRC, jugando un importante rol en la estabilidad del complejo galectina-ligando.

Tal como se analizó en el capítulo 4, los subsitios A-B y D-E presentan diferencias entre las distintas galectinas, permitiendo distinta especificidad por los distintos ligandos  $\beta$ -galactósidos. (Figura 4.3 y 4.4).

En este capítulo se describen los resultados de la evaluación biológica *in vitro* de los cinco galactocompuestos sintetizados (capítulo 3) junto con 5 galactocompuestos comerciales (Figura 5.1).

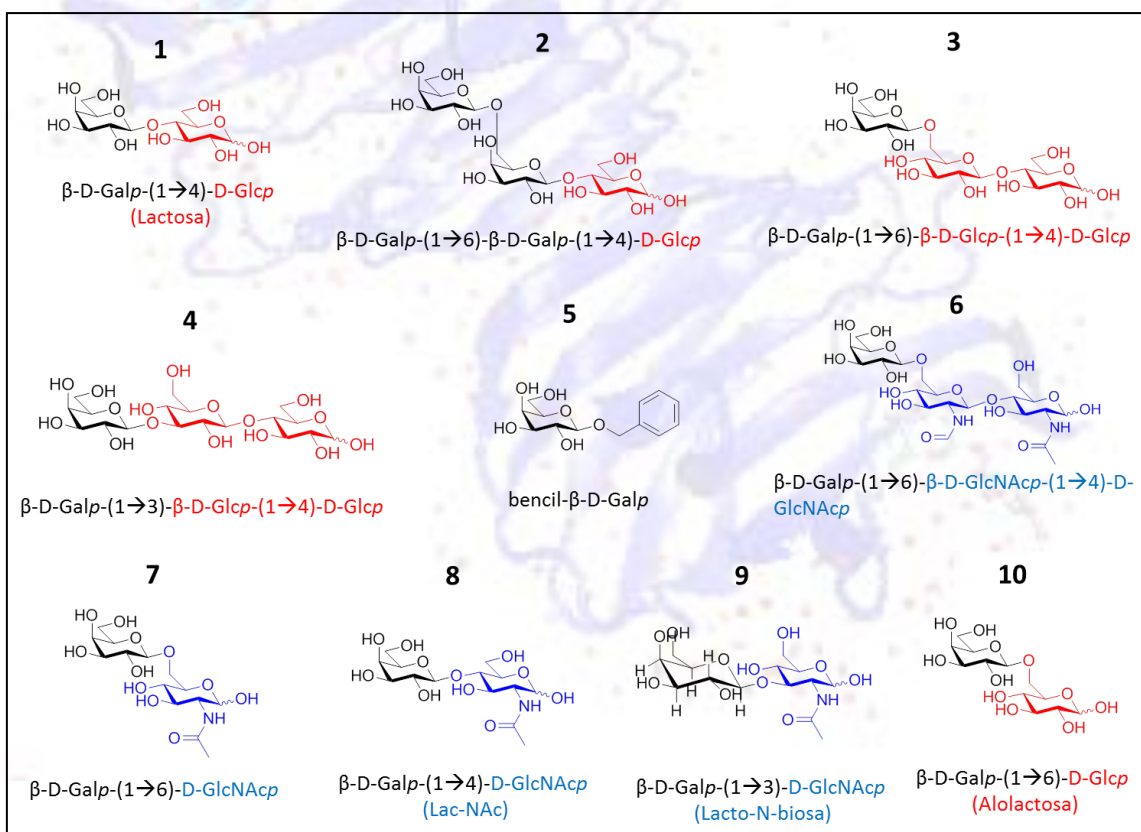


Figura 5.1. Estructuras de los ligandos analizados

Dicha evaluación se realizó utilizando dos ensayos *in vitro*, uno de competencia en fase sólida (SPA por sus siglas en inglés, Solid Phase Assay) para hGal-1 y hGal-3 (galectinas 1 y 3 recombinantes humanas, respectivamente) y otro mediante titulación de

calorimetría isotérmica (ITC por sus siglas en inglés Isothermal Titration Calorimetry) (solo para hGal-1). Estos ensayos se llevaron a cabo en el marco de dos pasantías realizadas en 2017 y 2019 en el Laboratorio de Glicómica Funcional y Molecular, del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME- CONICET), en la ciudad de Buenos Aires, Argentina. Dicha pasantía se realizó bajo la supervisión de los Drs. Alejandro J. Cagnoni y Karina Mariño.

El ensayo de inhibición de galectina en fase sólida es un ensayo de competencia en el cual el ligando a ser evaluado y asialofetuina (ASF), una glicoproteína con numerosas LacNAc terminales<sup>13,14</sup>, compiten por la unión al DRC de la galectina. La ASF se obtiene por desialilación química de la fetuina<sup>15</sup>. En una primera etapa la galectina se incuba con el ligando a evaluar por un tiempo determinado. A continuación dicha mezcla se incuba en una placa de 96 pocillos de fondo plano con la asialofetuina inmovilizada en su superficie<sup>16,17</sup>. Si la galectina tiene mayor afinidad por el ligando evaluado que por los glicanos de la ASF, el ligando previamente unido a la galectina no podrá ser desplazado por los glicanos de la ASF y la galectina no se unirá a la ASF inmovilizada en la placa. Por el contrario, si la interacción galectina-ligando es débil, los ligandos de la ASF desplazarán al ligando previamente unido y la galectina se unirá a la ASF quedando retenida en la placa. Para evaluar la unión galectina-ASF, se incuba la placa en presencia de un anticuerpo biotinilado específico para la galectina. Luego se incuba con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada a estreptavidina, la que se une a la biotina con alta afinidad. Finalmente se revela con tetrametilbencina (TMB), que es sustrato de la peroxidasa. Al detener la reacción enzimática con ácido sulfúrico, se obtiene un color amarillo producto de la oxidación del producto enzimático, cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 450 nm y 550 nm. Una mayor intensidad de color, implica mayor cantidad de galectina unida a ASF, por lo tanto, menor afinidad por el ligando evaluado.

Por otro lado, se estudió la interacción hGal-1 con los distintos ligandos mediante ITC. En la titulación de calorimetría isotérmica se mide la liberación o absorción de calor debido a una reacción bi-molecular. De esta forma se obtiene una medida directa de la energía de interacción en un proceso biológico, siendo una técnica ampliamente aplicada en el estudio de galectinas<sup>18-21</sup>. El calorímetro cuenta con dos celdas en

equilibrio térmico (referencia y muestra). Se coloca la galectina a evaluar en la celda de muestra, y se inyectan en dicha celda, a intervalos regulares, cantidades conocidas de ligando. El equipo mide la diferencia de temperatura entre ambas celdas. Dicha diferencia corresponderá únicamente a la interacción proteína-ligando, permitiendo determinar parámetros termodinámicos característicos de la unión como  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$ ,  $K_a$  y la estequiometría de la reacción. El análisis con ITC se realizó solo para las interacciones entre la hGal-1 y los diferentes ligandos. Este tipo de estudios requiere una cantidad considerable de galectina. En el laboratorio de la Dra. Mariño han puesto a punto la producción y purificación de hGal-1, mientras que en el caso de hGal-3 se trabajó con una galectina de origen comercial, cuyo costo hizo inviable la realización de dicho ensayo.

Los resultados experimentales se compararon con los estudios *in silico* de docking molecular descritos en el capítulo 4. Esta comparación tiene una doble finalidad, por un lado, se buscaba ver si el modelado de las interacciones galectina-ligando podía explicar los resultados experimentales. El segundo objetivo era ver si se podía establecer una correlación entre los resultados teóricos y experimentales de forma de evaluar si las herramientas teóricas puestas a punto a lo largo del desarrollo de esta tesis podrían ser utilizadas con fines predictivos a los efectos de ser aplicadas para un diseño racional de inhibidores de galectinas.



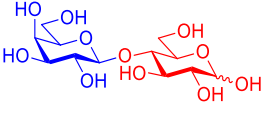
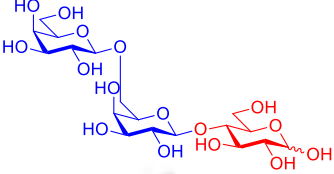
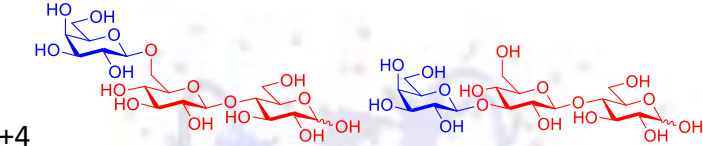
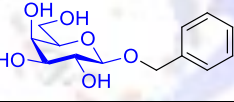
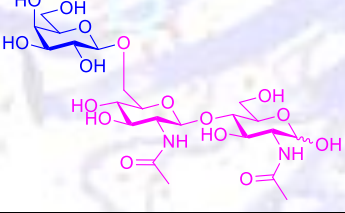
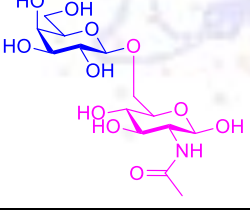
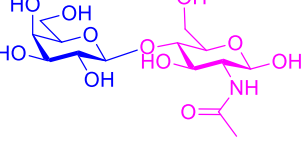
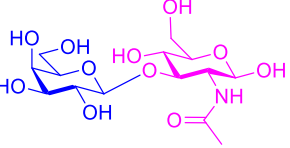
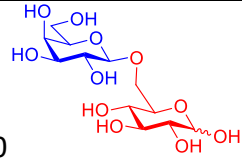
## 5.2. RESULTADOS

### 5.2.1. Análisis de la interacción galectina-ligando mediante ensayo en fase sólida

Mediante los ensayos de SPA se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> (concentración de ligando a la cual se logra inhibir el 50 % de la galectina) para cada uno de los ligandos. Tomando como referencia a la lactosa se definió la potencia relativa (PR) como el cociente entre el IC<sub>50</sub> de la lactosa y el IC<sub>50</sub> del ligando a evaluar. Mirado en términos de potencia relativa, a mayor valor, mejor potencialidad como inhibidor de galectina. A su vez valores de PR superiores a 1 indican una mejor capacidad del ligando de inhibir la galectina en relación a la lactosa (ligando tomado como referencia). En la Tabla 5.1 se puede observar que el orden decreciente de PR es el siguiente: **8 = 9 > 1 > 7 > 2 > 3 + 4 > 6 > 5 > 10** para hGal-1 y **9 > 8 > 1 > 6 > 2 > 7 > 10 > 3 + 4 > 5** para hGal-3.

LacNAc (**8**) y Lacto-*N*-biosa (**9**) presentaron valores de PR superiores a 1 para ambas galectinas lo que indica que son mejores ligandos que la lactosa y por lo tanto mejores inhibidores de las galectinas. Este resultado era esperable ya que los mismos forman parte de la estructura de los glicanos de las glicoproteínas que se han reportado como ligandos naturales de las galectinas<sup>22</sup>. Por el contrario, el resto de los ligandos presentan PR menores a 1 indicando una menor afinidad de la galectina por ellos en relación a la lactosa. El PR para el compuesto **7** es entre 4 y 7 veces menor que el de los compuestos **8 y 9**, dependiendo de la galectina. Los tres compuestos son isómeros diferenciándose únicamente en el enlace glicosídico entre la galactosa y la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), que en el caso del compuesto **7** es β-(1→6). También se observa que la PR de la alolactosa (**10**) es tres veces menor que la lactosa para hGal-3 no pudiendo registrarse interacción entre la alolactosa y hGal-1. Una vez más la única diferencia entre las estructuras de ambos compuestos es el enlace entre la galactosa y la glucosa, que en la alolactosa es β-(1→6) mientras que en la lactosa es β-(1→4).

Tabla 5.1. Potencias relativas obtenidas en el ensayo en fase sólida (SPA)

Ligando	PR* hGal-1	PR* hGal-3
 <p>1 (lactosa)</p>	1	1
 <p>2</p>	0.32	0.38
 <p>3 +4</p>	0.29	0.22
 <p>5</p>	0.09	0.05
 <p>6</p>	0.22	0.81
 <p>7</p>	0.35	0.36
 <p>8 (LacNAc)</p>	2.37	1.54
 <p>9</p>	2.37	2.25
 <p>10</p>	No se observó unión a hGal-1	0.35

\*Potencia relativa:  $IC_{50}$  lactosa/ $IC_{50}$  compuesto

Estos resultados estarían indicando que el tipo de enlace entre la galactosa y el monosacárido unido a su carbono anomérico sería crítico para la afinidad. En función

de los resultados de este ensayo, se podría concluir que compuestos isómeros con enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) presentarían mayor afinidad que aquellos con enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) para hGal-1, mientras que el orden de preferencia para hGal-3 sería  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) >  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) >  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6).

De los compuestos sintetizados enzimáticamente el bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido (**5**) demostró ser un mal ligando ya que presenta una PR 11 y 20 veces menor que la lactosa para hGal-1 y hGal-3, respectivamente. Esto indicaría que la sustitución de un anillo piranosa por un anillo aromático sería desfavorable para la afinidad.

Tanto el compuesto **2** como la mezcla **3+4** presentaron menor PR que la lactosa lo que podría atribuirse a que la galactosa terminal se encuentra unida al siguiente azúcar mediante enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), tanto en el compuesto **2** como en el **3** (mayoritario en la mezcla **3+4**). Por otro lado, el compuesto **2** y la mezcla de compuestos **3+4**, mostraron PR similares para hGal-1, sin embargo, el compuesto **2** presenta mayor PR que la mezcla de compuestos **3+4** para hGal-3. En función de estos resultados se podría pensar que hGal-1 no tendría preferencias de unión entre una glucopiranososa o una galactopiranososa en el subsitio D, mientras que hGal-3 presentaría mayor afinidad por el ligando si el azúcar unido a la galactosa terminal es una galactopiranososa.

También el compuesto **6** muestra un comportamiento diferencial frente a cada galectina. Dicho ligando, presenta una disminución de su PR respecto a la lactosa de 4.5 y 1.3 veces para hGal-1 y hGal-3, respectivamente. Dado que el compuesto **6** presenta una unidad adicional de GlcNAc en relación al compuesto **7**, los resultados de potencia relativa indicarían que el agregado de este tercer residuo generaría un aumento de afinidad de hGal-3 por el ligando ya que la PR aumenta de 0.36 (para el **7**) a 0.81 (para el **6**) mientras que tendrían el efecto contrario para hGal-1 donde se produce una disminución en el PR de 0.35 a 0.22.

Varios residuos en el subsitio D son idénticos en hGal-1 y hGal-3, excepto en el caso de la Gly53 y el Asp54 en hGal-1 que son reemplazados por la Asn166 y Asn167 en hGal-3 (Figura 5.2). Esto podría explicar las diferencias en la selectividad entre ambas galectinas.

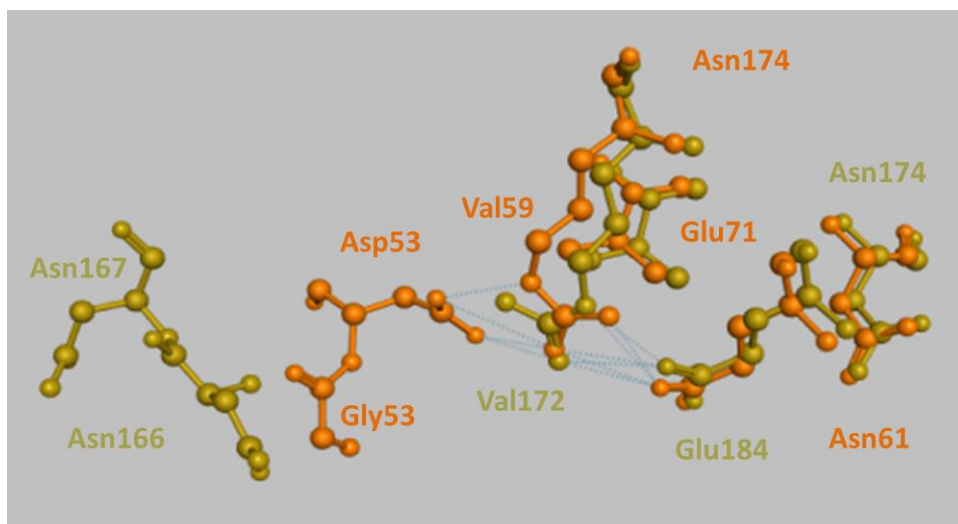


Figura 5.2. Superposición del subsitio D de hGal-1 (Naranja) y hGal-3 (Amarillo).

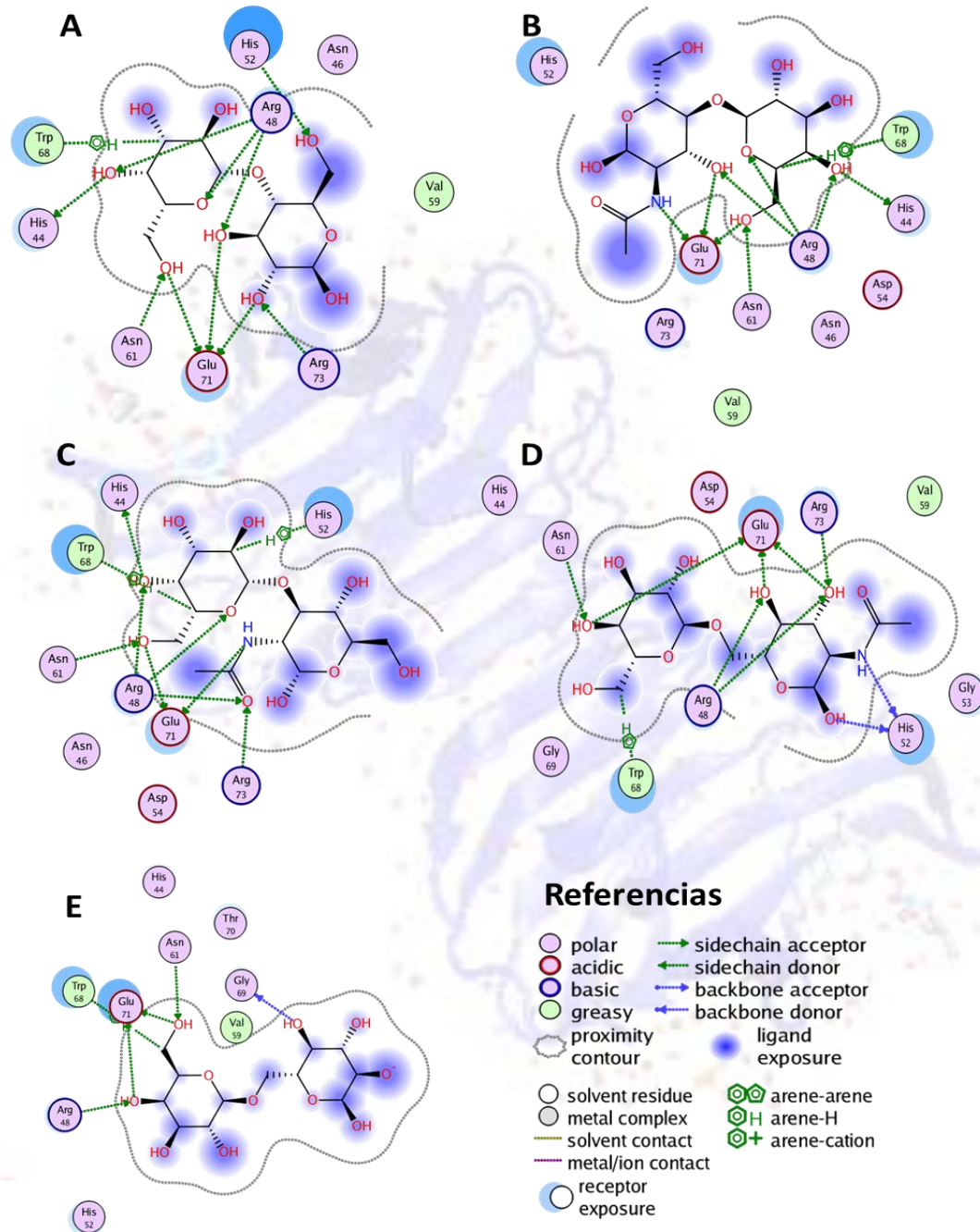
### 5.2.2. Estudios teóricos de interacción galectina-ligando mediante docking molecular

Como ya se describió en el capítulo 4, se realizó un estudio de docking molecular entre los galactocompuestos (**1-10**) con las galectinas hGal-1 y hGal-3. Para ello se tuvo en cuenta los requerimientos estructurales tanto de las proteínas como de los galactocompuestos, que fueron previamente modelados. Esta metodología *in silico* permite un mejor análisis de los requerimientos estructurales para las interacciones entre los distintos ligandos y las galectinas.

Se utilizaron dos programas para llevar a cabo los experimentos de docking: Schrödinger y AUTODOCK 4.2. Los primeros experimentos fueron realizados en el programa Schrödinger a través de la interface gráfica Maestro (Maestro V.10.2; New York, 2015) y se seleccionaron las mejores poses tomando como criterio el grado de ajuste de la galactosa terminal al subsitio C. Las diferencias en las energías de unión obtenidos a partir del IFDscore obtenido en este experimento son muy similares, lo que no permite establecer un orden de afinidad de las galectinas por cada uno de los ligandos (Tabla 4.2).

A partir de las poses seleccionadas, se realizaron diagramas para analizar las interacciones entre hGal-1 y hGal-3 con los ligandos evaluados (Figuras 5.3 – 5.6 y Anexo 4.6.1.1 – 4.6.2.10 poses en 3D). Tal como se mencionó previamente, la fuerza de la interacción entre la galectina y su ligando se define en función de una serie de enlaces de hidrógeno entre los residuos polares del DRC y los múltiples hidroxilos del azúcar. A su vez, a pesar de ser moléculas altamente hidrofílicas, los carbohidratos

pueden interactuar con residuos aminoacídicos aromáticos a través de interacciones de tipo  $\pi$ -H entre el Trp68 para hGal-1 o el Trp181 para hGal-3 y el anillo piranosa de la galactosa unido al subsitio C <sup>8,10,23</sup>.



**Figura 5.3.** Interacciones entre hGal-1 y los siguientes ligandos comerciales: A: ligando 1; B: ligando 8, C: ligando 9; D: ligando 7; E: ligando 10

En la Figura 5.3A (Anexo A.4.6.1.1) se puede visualizar al ligando lactosa (**1**) donde el residuo de galactosa está inserto en el subsitio C, y se identifican la mayoría de las interacciones esperadas con hGal-1 de acuerdo a lo reportado en bibliografía <sup>6,24</sup>.

Estas incluyen la interacción  $\pi$ -H entre el Trp68 y el anillo piranosa de la galactosa y los enlaces de hidrógeno entre el O4 de la galactosa y los residuos His44 y Arg48 y el O5 de la galactosa y la Arg48. A su vez, se observa la interacción entre el O6 de la galactosa con la Asn61 y la Glu71 pertenecientes al subsitio D así como enlaces de hidrógeno a nivel del subsitio D entre el O2 de la glucosa y los residuos Glu71 y Arg73 y el O3 de la glucosa con Arg48 y Glu71.

La identificación de las interacciones entre hGal-1 y la lactosa previamente reportadas en bibliografía validan los modelos propuestos para los experimentos de docking <sup>11</sup>.

Para la LacNAc **(8)** (Figura 5.3B, Anexo A.4.6.1.8) y Lacto-*N*-biosa **(9)** (Figura 5.3C, Anexo A.4.6.1.9) donde la galactosa se encuentra unida a una GlcNAc por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) respectivamente, se mantienen las interacciones entre el residuo de galactosa y hGal-1 observándose interacciones adicionales entre el residuo de GlcNAc y hGal-1.

Para LacNAc **(8)** se pueden apreciar la formación de tres enlaces de hidrógeno, uno entre el Glu71 y el nitrógeno del grupo *N*-acetilo de la GlcNAc y otro entre el O3 de la GlcNAc y los residuos Glu71 y Arg48. Por otra parte, cuando el ligando es Lacto-*N*-biosa **(9)** se pueden observar interacciones entre el nitrógeno del grupo *N*-acetilo con el Glu71 y del oxígeno carboxílico del mismo grupo y las Arg73 y Arg48. Estas interacciones adicionales podrían justificar el aumento de afinidad respecto a la lactosa observada en los ensayos de SPA.

Sin embargo cuando el enlace entre la galactosa y la GlcNAc es  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) como en el compuesto **7** (Figura 5.3D, Anexo A.4.6.1.7), se pierden muchas de las interacciones características entre la galactosa y el subsitio C, entre ellas la interacción entre el O4 de la galactosa y la His44. Aunque se establecen interacciones entre el nitrógeno del grupo *N*-acetilo de la GlcNAc y la His52, y entre el O1 de la GlcNAc y la His52, al igual que entre el O3 de la GlcNAc y las Arg73, Glu71 y Arg48, y entre el O4 del mismo residuo y el Glu71 y Arg48, no se lograría compensar la disminución de la afinidad generada por la pérdida de las interacciones con la galactosa. Una posible explicación es que el enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) entre ambos residuos no permita que la galactosa se oriente de forma adecuada, perdiéndose las interacciones típicas entre hGal-1 y la galactosa.

Esto favorecería la formación de nuevas interacciones con el residuo de GlcNAc, y por ende no permitiría un buen anclaje de la galactosa en el subsitio C.

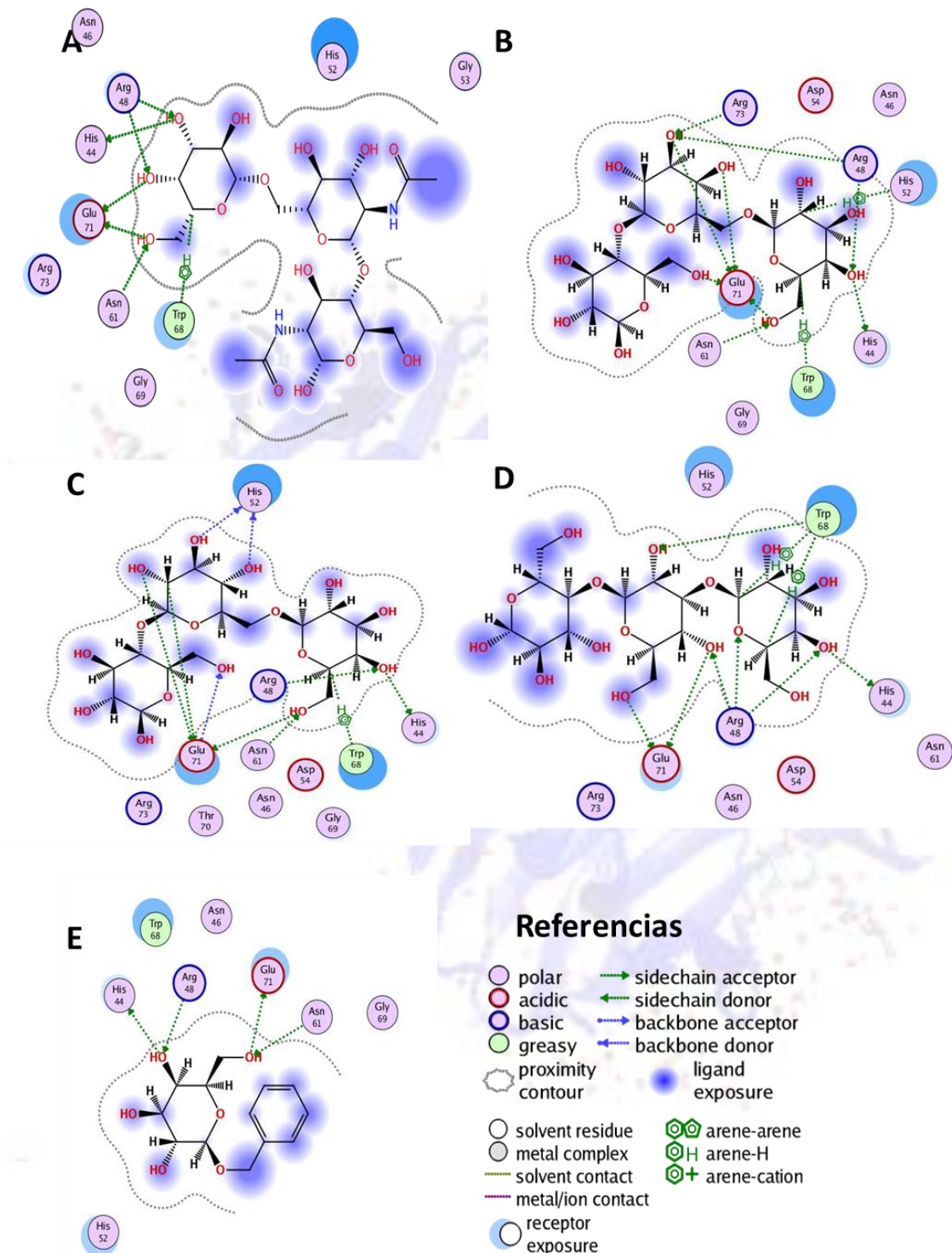


Figura 5.4. Interacciones entre hGal-1 y los siguientes ligandos sintetizados enzimáticamente: A: ligando 6; B: ligando 2, C: ligando 3; D: ligando 4; E: ligando 5.

Esto podría llevar a una pérdida de la afinidad de hGal-1 por el compuesto 7 en relación a sus isómeros LacNAc y lacto-*N*-biosa.

En el mismo sentido, para el compuesto **6** (Figura 5.4A, Anexo A.4.6.1.6), sintetizado enzimáticamente, también se observa la pérdida de la interacción entre el O4 de la galactosa y la His44 aunque se establece una nueva interacción con el Glu71 así como el O3 y los residuos His44 y Arg48. A su vez la falta de interacciones con la unidad de GlcNac adyacente a la galactosa podría justificar un valor de PR aún menor que para el compuesto **7** donde también la galactosa se encuentra unida a una unidad de GlcNac por un enlace  $\beta$ 1-6.

Los ensayos en fase sólida indican que no se pudo establecer interacción entre hGal-1 y el compuesto **10** (Figura 5.3E, Anexo A.4.6.1.10), isómero de la lactosa donde el enlace glicosídico entre la galactosa y la glucosa es  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). También en este caso se puede observar la pérdida del enlace de hidrógeno entre el O4 de la galactosa y la His44 como en los casos anteriores. Esto daría más fuerza a la hipótesis de que la formación del enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) entre la galactosa y la glucosa o GlcNac favorece que la galactosa no se oriente adecuadamente, evitando un buen ajuste de la misma en el subsitio C.

En relación a las interacciones de hGal-1 con los compuestos **2** (Figura 5.4B, Anexo A.4.6.1.2), **3** (Figura 5.4C, Anexo A.4.6.1.3) y **4** (Figura 5.4D, Anexo A.4.6.1.4), en todos los casos se pueden identificar algunas de las interacciones características entre el residuo de galactosa y hGal-1 observadas previamente para la lactosa. A su vez el compuesto **2** presenta interacciones mediante enlaces de hidrógeno entre el O4 de la galactosa adyacente a la galactosa terminal y el Glu71, y entre el O3 de la misma galactosa con la Arg48, Arg73 y Glu71. Por último, se observa un enlace de hidrógeno entre el O6 de la glucosa reductora y el Glu71.

Por su parte el compuesto **3** presenta enlaces de hidrógeno entre el O4 de la glucosa adyacente a la galactosa con la His52, y entre el O3 y O2 del mismo residuo con la His52 y el Glu71 respectivamente. Finalmente, para el compuesto **4** (Figura 5.4D, Anexo A.4.6.1.4) también se observan interacciones entre la glucopiranososa adyacente a la galactosa y hGal-1, el O4 forma enlaces de hidrógeno entre la Arg48 y el Glu71, el O6 con el Glu71 y el O2 con el Trp68.



Al analizar las interacciones entre el compuesto **5** (Figura 5.4E, Anexo A.4.6.1.5) y hGal-1 se observa la pérdida de interacción con el Trp68 mediante enlaces  $\pi$ -H al igual que algunas de las interacciones características entre el residuo de galactosa y la hGal-1. Por otra parte, no se observan interacciones entre el anillo aromático unido a la galactosa y la hGal-1. La pérdida de estas interacciones justifica que el PR del compuesto 5 sea tan bajo.

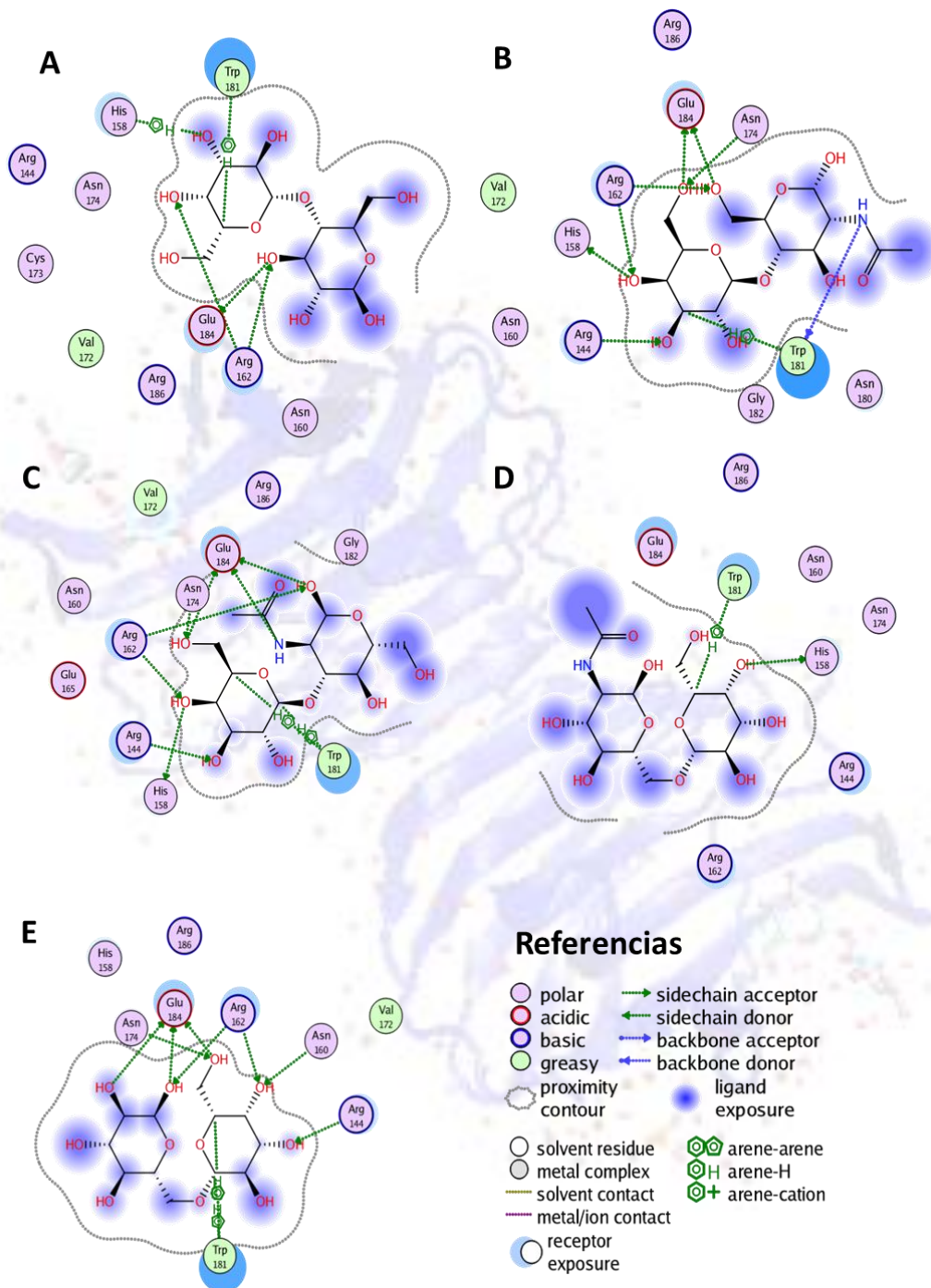
A pesar de que existe menos información disponible respecto de las interacciones entre hGal-3 con diferentes ligandos, ciertas interacciones son esperables en función de que el subsitio C está altamente conservado en las galectinas. Sin embargo, el subsitio D presenta diferencias entre hGal-1 y hGal-3 lo que podría traducirse en diferencias en la especificidad de sus ligandos.

Cuando se analizan las interacciones entre lactosa (**1**) y hGal-3 (Figura 5.5A, A.4.6.2.1) se observa la formación de un enlace de hidrógeno entre el O4 de la galactosa y la Arg162, mientras que la formación del enlace de hidrógeno con la His158, que era de esperar de acuerdo a lo reportado <sup>25</sup>, no se observa y se sustituye por una interacción areno-H entre el anillo imidazólico de la His158 y el H del O3 de la galactosa.

También se observa la interacción  $\pi$ -H entre el residuo de galactosa y el Trp181. Además de esas interacciones, se forman dos enlaces de hidrógeno adicionales entre el O3 del residuo glucopiranosido y la Arg162 y el Glu184.

Para la LacNAc (**8**) y Lacto-*N*-biosa (**9**) (Figura 5.5B y C, Anexo A.4.6.2.8 y A.4.6.2.9) se mantiene la interacción  $\pi$ -H entre la galactosa y el Trp181, al igual que los enlaces de hidrógeno entre O4 de la galactosa y la Arg162 y la His158. Ambos compuestos presentan enlaces de hidrógeno adicionales entre el O3 de la galactosa y Arg144, y el O6 de la galactosa y los residuos Asn174 y Glu 184. El residuo GlcNAc del compuesto **8** presenta interacciones por enlace de hidrógeno entre el O6 y Arg162 y Glu184, así como una estabilización adicional entre el *N*-acetilo del C2 y el Trp181. Es posible que estas interacciones expliquen que la PR sea mayor que uno para la interacción entre LacNAc y hGal-3, como se observa en los ensayos de SPA. A su vez la lacto-*N*-biosa (**9**) presenta una interacción entre el nitrógeno del grupo *N*-acetilo de la GlcNAc con el

residuo Glu184 al igual que interacciones por puente de hidrógeno entre el O1 de este residuo y los residuos de Arg162 y Glu184.



**Figura 5.5.** Interacciones entre hGal-3 y los siguientes ligandos comerciales: **A:** ligando 1; **B:** ligando 8, **C:** ligando 9; **D:** ligando 7; **E:** ligando 10.

Estas interacciones adicionales podrían justificar el aumento de la PR en los ensayos de SPA aún mayores que para la LacNAc.

Por otro lado es notoria la pérdida de interacciones entre el compuesto **7** y hGal-3 (Figura 5.5D, Anexo A.4.6.2.7), isómero de los compuestos **8** y **9** donde la galactosa se encuentra unida a la GlcNAc por enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). En este caso solo se mantienen los enlaces  $\pi$ -H entre el anillo piranosa de la galactosa y el Trp181 y el enlace de hidrógeno entre O4 de la galactosa y el residuo de His158. La pérdida de estas interacciones entre la galactosa y el subsitio C de hGal-3 podrían justificar la disminución del PR del compuesto **7** en relación **8** y **9**. Sin embargo este efecto se revierte en forma parcial cuando se agrega un residuo de GlcNAc al compuesto **7** para formar el compuesto **6** (Figura 5.6A, Anexo A.4.6.2.6), no obstante esto no se explica por un aumento en las interacciones del tercer residuo y del DRC de hGal-3.

En el caso de la alolactosa (**10**) (Figura 5.5E, Anexo A.4.6.2.10) isómero de la lactosa donde la unión de la galactosa a la glucosa se da por enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), se pierde la interacción  $\pi$ -H entre la His158 y el H del O3 de la galactosa observada para la lactosa. Se observan interacciones adicionales entre O6 de la galactosa y los residuos Asn174 y Glu184, al igual que entre O3 de la galactosa y Arg144, y entre el residuo O1 de glucosa y los residuos Arg162 y Glu184, y entre O2 de la glucosa y el Glu184. Si bien se observa un aumento de interacciones entre alolactosa y el DRC de hGal-3, la pérdida de algunos de los enlaces característicos con la galactosa podría explicar la disminución de PR observada en el ensayo de SPA.

Cuando se analizan las interacciones entre hGal-3 y los compuestos sintetizados enzimáticamente **2** (Figura 5.6B, Anexo A.4.6.2.2), **3** (Figura 5.6C, Anexo A.4.6.2.3) y **4** (Figura 5.6D, Anexo A.4.6.2.4) se observa que se mantiene la interacción  $\pi$ -H entre el anillo galactopiranósico y el Trp181. Para el compuesto **3** también se mantienen las interacciones del O4 de la galactosa con los residuos Arg162 e His158.

Finalmente, para el compuesto **5** (Figura 5.6E, Anexo A.4.6.2.5) se mantienen las interacciones entre el residuo de galactosa y el subsitio C previamente observadas para la lactosa, no observándose interacción con ninguno de los residuos del subsitio D.

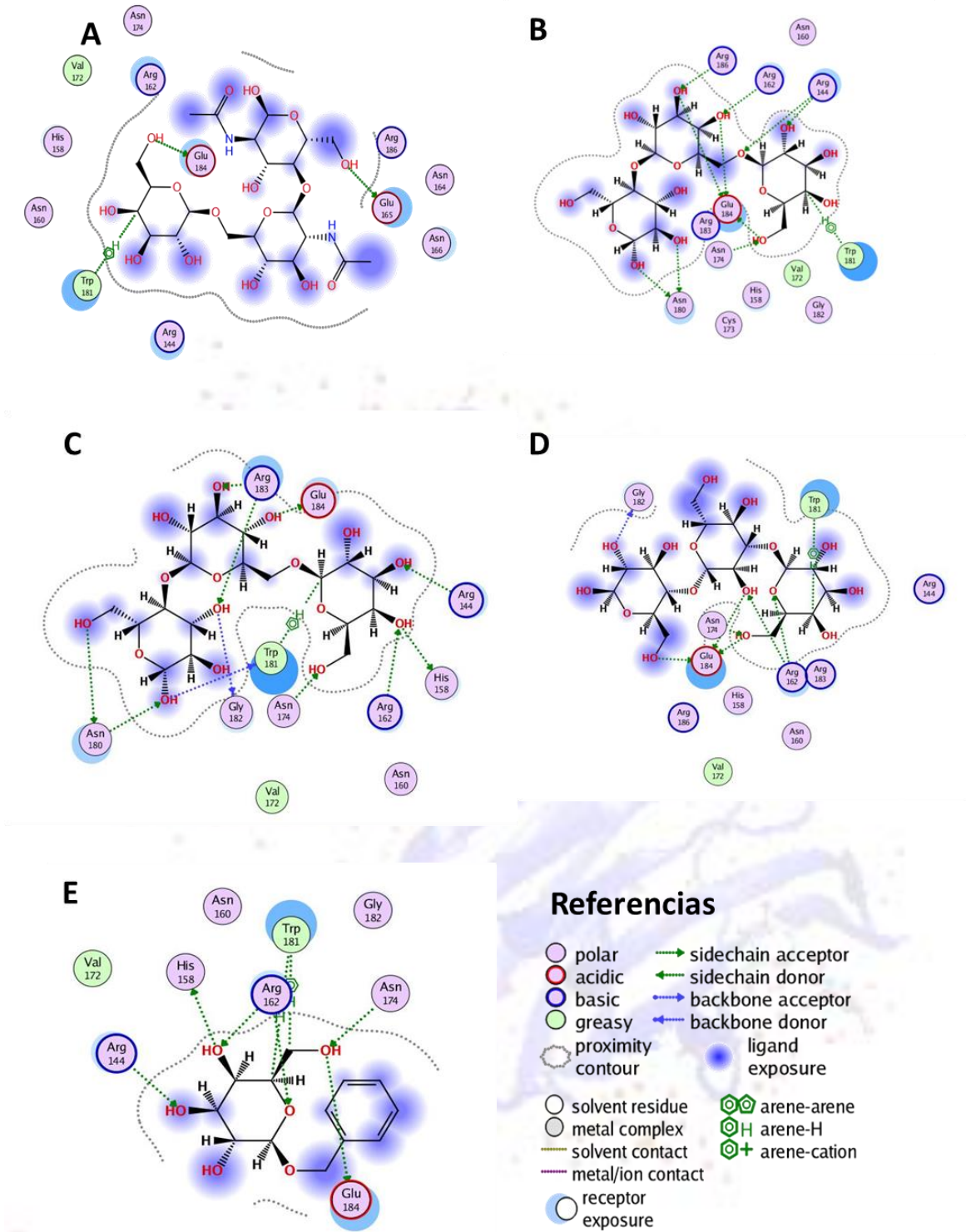


Figura 5.6. Interacciones entre hGal-3 y los siguientes ligandos sintetizados enzimáticamente: A: ligando 6; B: ligando 2, C: ligando 3; D: ligando 4; E: ligando 5.

### 5.2.3. Análisis de interacción hGal-1 ligando mediante Titulación Calorimétrica Isotérmica

A partir de los termogramas del ITC se pueden obtener distintos parámetros termodinámicos y cinéticos que se pueden observar en la tabla 5.2. La constante de asociación ( $K_a$ ) es una medida de la afinidad de la galectina por el ligando, donde a mayor valor de la constante  $K_a$  mayor es la afinidad. Los valores de  $K_a$  obtenidos demuestran una tendencia similar a la observada con el ensayo en fase sólida. En este caso el orden decreciente de afinidad es **8 > 9 > 1 > 7 > 2 > 6 > 3 + 4 > 5 > 10**.

También se calculó el  $\Delta G$  correspondiente, a partir de los valores obtenidos de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  ( $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ ). El valor obtenido para los compuestos **8** y **1**, es muy similar al reportado previamente por otros autores<sup>20</sup>.

En este caso cuanto mayor es el valor del  $\Delta G$  en valor absoluto mayor es la afinidad de la galectina por el ligando. Dada la similitud entre los valores de  $\Delta G$ , al igual que ocurría con los cálculos del docking molecular, es difícil predecir una tendencia de afinidad a partir de estos valores.

Tabla 5.2. Parámetros determinados a partir de ITC y comparación con los obtenidos por AUTODOCK

Compuesto	$K_a$ ( $M^{-1}$ )*	$n^{**}$	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/K mol)	$-T \cdot \Delta S$ (kJ/mol)	$\Delta G_{unión}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{unión}$ (KJ/mol) estimado (MOE)***
<b>1</b>	5348	1.01	-45.2	-80.2	23.9	-21.3	-22.3
<b>2</b>	1954	1.00	-4.0	55.3	-15.0	-19.0	-22.7
<b>3 + 4</b>	1183	1.00	-6.2	41.2	-11.2	-17.4	-21.9
<b>5</b>	882	1.00	-0.5	64.2	-17.8	-18.3	-20.7
<b>6</b>	1298	0.97	-15.3	8.4	-2.5	-17.8	-17.9
<b>7</b>	2004	1.08	-17.9	3.0	-0.9	-18.8	-21.5
<b>8</b>	10416	1.13	-50.3	-91.9	27.4	-22.9	-28.0
<b>9</b>	6211	0.95	-47.7	-87.2	26.0	-21.7	-24.8
<b>10</b>	753	0.98	-7.5	90.7	-8.9	-16.4	-19.2

\* $K_a$ : constante de asociación; \*\*  $n$ : estequiometría de la reacción. \*\*\* Esta estimación se realizó a partir de la mejor pose seleccionada del experimento de Docking Molecular en AUTODOCK.

Para hGal-1 se compararon las energías de unión,  $\Delta G_{unión}$ , obtenidas experimentalmente por ITC, con las estimadas en MOE a partir de las mejores poses obtenidas en los experimentos de docking en AUTODOCK 4.2 (dicho experimento se explicó en detalle en el capítulo 4).

Los  $\Delta G_{\text{unión}}$  para cada compuesto son muy similares lo que estaría validando el modelo teórico desarrollado y permitiría utilizarlo como una buena aproximación para predecir interacciones ligando-galectina. Por otro lado confirma que no hay grandes diferencias entre los  $\Delta G$  de unión entre los distintos ligandos y la hGal-1. Esto implicaría que las diferencias estructurales entre los ligandos estudiados generan cambios muy sutiles en relación a la afinidad de la galectina por cada uno de ellos por lo cual es difícil establecer un orden de afinidad confiable basado en los valores de  $\Delta G$ .

### 5.3. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar la importancia de la estructura del ligando en la interacción galectina-carbohidrato, la misma se estudió mediante estrategias experimentales (SPA e ITC) al igual que mediante aproximaciones teóricas *in silico* (docking molecular).

Las estrategias utilizadas evalúan diferentes fenómenos. El SPA es un ensayo de competencia dónde se mide la capacidad de cada uno de los ligandos de competir con la ASF (buen ligando de las galectinas) por la unión al DRC de las galectinas. Este es un fenómeno similar al que tendría lugar *in vivo* si los ligandos fueran utilizados como inhibidores de galectinas. Por otro lado, tanto el ITC como los ensayos de docking se basan en el cálculo de energía de unión entre el ligando y la galectina. Si bien es una medida más directa de la afinidad y permite calcular una constante de afinidad, no toma en cuenta la competencia con otros ligandos, que es lo que ocurriría *in vivo*. Por lo cual no se esperaba obtener resultados idénticos entre los ensayos, sino evaluar si se podía establecer una correlación entre la estructura de los distintos ligandos y su capacidad para unirse a la galectina de forma de poder inhibir su actividad.

Los ensayos en fase sólida con hGal-1 indicarían que LacNac (**8**) y lacto-*N*-biosa (**9**) serían mejores ligandos que la lactosa. Este hecho se confirma en función de las constantes de afinidad calculadas por ITC. A su vez los estudios de docking permiten analizar las interacciones mediante enlaces de hidrógeno entre la amida del grupo *N*-acetilo de la GlcNAc y aminoácidos del DRC de hGal-1, lo que explicaría el aumento de afinidad en relación a la lactosa, y por ende su potencialidad como inhibidores de hGal-1.

Por otro lado los ensayos en fase sólida permiten ver una disminución en la PR cuando el enlace entre la galactosa y la GlcNAc, o entre la galactosa y la glucosa es  $\beta$  1-6 en lugar de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) o  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), como ocurre en el compuesto **7** cuando se compara con sus isómeros **8** y **9**, o con el compuesto **10** cuándo se compara con su isómero **1** (Tabla 5.1). Estos resultados también se confirman en los estudios de ITC y podrían atribuirse a que la formación de un enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) entre la galactosa y la glucosa o GlcNAc podrían generar un cambio de conformación en la molécula que no permitiría un buen ajuste de la galactosa en el subsitio C como surge del análisis de las interacciones que se observan en los estudios de docking.

Otro aspecto a resaltar es que la sustitución de una piranosa unida a la galactosa anclada en el subsitio C por un anillo aromático no es favorable para la unión a la galectina, como lo demuestran los resultados obtenidos para el compuesto **5** evaluado por cualquiera de las metodologías utilizadas.

En cuanto a los cambios estructurales introducidos en los ligandos mediante síntesis enzimática se puede observar que la sustitución de una glucopiranososa (**3**) adyacente a la galactosa por una galactopiranososa (**2**) no generaría un cambio muy significativo en la afinidad para la hGal-1. Esto surge de comparar las PR y las constantes de afinidad del compuesto **2** y de la mezcla (**3+4**) calculados por SPA y por ITC, respectivamente; confirmado además por las energías de unión calculadas a partir de los estudios de docking, donde el  $\Delta G$  de unión para el compuesto **2** es levemente menor que el del compuesto **3** (Tabla 4.2). Hay que considerar también que el compuesto **4**, presente en la mezcla **3+4** presenta un enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) mientras que los otros dos compuestos presentan enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6). Eso también podría influir en los valores obtenidos, por lo cual las pequeñas diferencias observadas no se pueden atribuir en forma exclusiva a la estructura del monosacárido unido a la galactosa anclada en el subsitio C. Otro aspecto a destacar es que la incorporación de un tercer residuo sacarídico no tendría un gran impacto en la afinidad de la hGal-1 por sus ligandos, ya que en general no se observa un aumento de la PR para los trisacáridos. En particular el compuesto **6** presenta menor PR y afinidad que el **7** calculados por SPA e ITC, respectivamente. Hay que destacar que ambos compuestos presentan el mismo tipo de enlace entre la galactosa

y la GlcNAc adyacente, por lo cual las diferencias observadas solo pueden ser atribuidas a la inserción del tercer residuo.

Los resultados obtenidos para hGal-3 no son tan lineales. Una vez más se observa un aumento en la PR cuando se sustituye la glucosa de la lactosa por una GlcNAc aunque en este caso es mayor cuando el enlace glicosídico es  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (Compuesto **9**) en relación al  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (compuesto **8**). Este efecto puede ser explicado por el aumento en las interacciones entre los ligandos y hGal-3 que surgen del estudio de docking molecular. Si bien se observa una disminución en la PR de los disacáridos con enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) respecto a sus isómeros con enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) no se encuentra una correlación tan clara con las interacciones observadas en los resultados de docking molecular.

En forma análoga a los resultados obtenidos para hGal-1 se puede concluir que es desfavorable la sustitución de un anillo de piranosa por un anillo aromático a nivel del subsitio D.

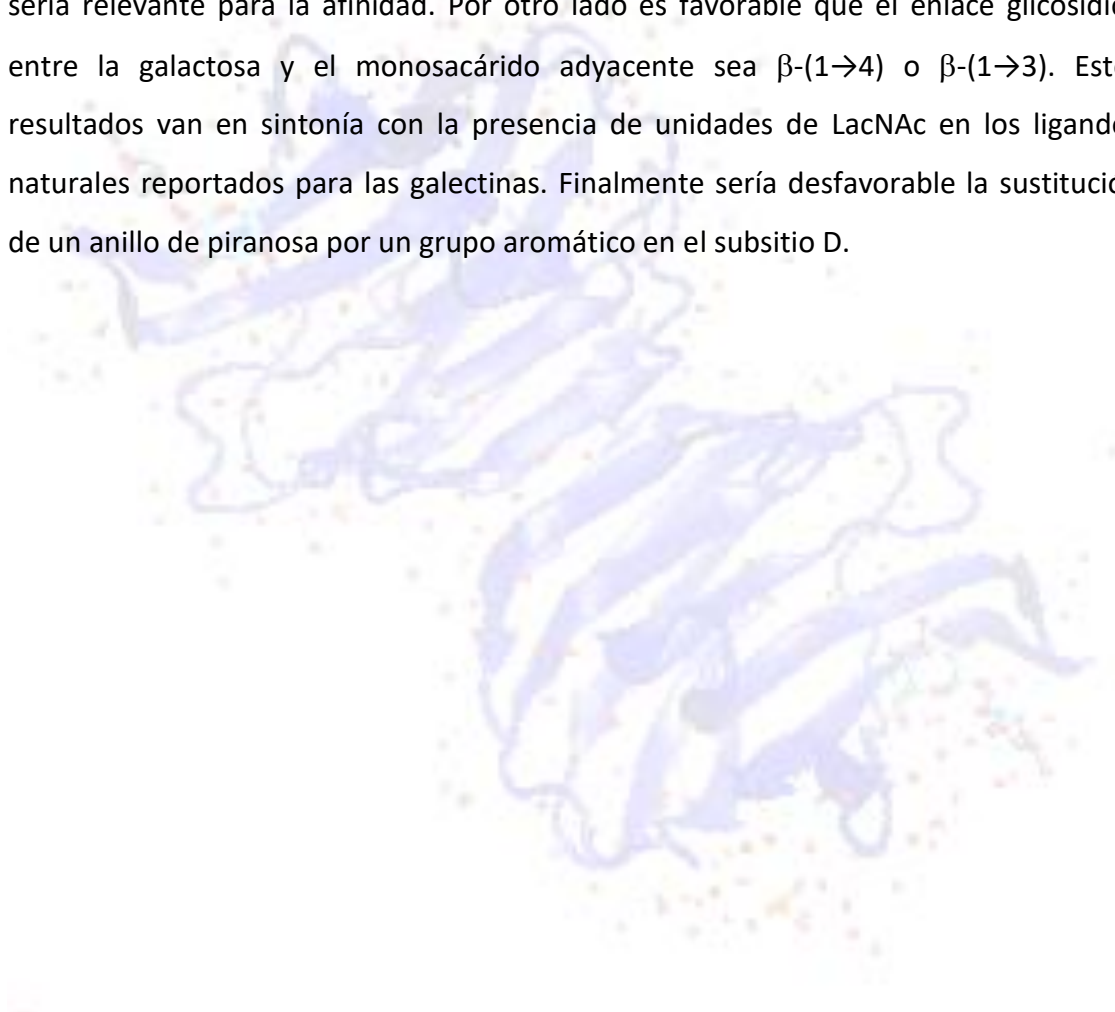
Si bien los estudios de SPA indicarían que para hGal-3 sería favorable la presencia de una galactopiranososa (compuesto **2**) en lugar de una glucopiranososa (compuestos **3+4**) adyacente a la galactosa esto no se refleja en las interacciones galectina-ligando que surgen de los estudios de docking. De acuerdo a la información reportada por bibliografía habría evidencias de que hGal-3 podría unirse a las galactosas internas y no necesariamente a una galactosa terminal<sup>26-28</sup>. En ese caso sería posible que la galactosa del compuesto **2** que se posicionara en el subsitio C no fuera la galactosa terminal sino la adyacente y en ese caso el subsitio D estaría ocupado por una glucosa. Esto podría ser verificado o bien con nuevos estudios de docking molecular o seleccionando una pose con estas características.

Algo curioso es que en el caso de la hGal-3 a diferencia de la hGal-1, la adición de un tercer residuo sacarídico al compuesto **7** para formar el compuesto **6** aumentaría la PR aunque esto no viene acompañado de un incremento en las interacciones que surgen del estudio de docking.

En definitiva, de los resultados de interacción galectina-ligando para hGal-1 y hGal-3 mediante las estrategias experimentales e *in silico* utilizadas, se podría concluir que todos los ligandos estudiados presentan una afinidad similar por el DRC de cada una de



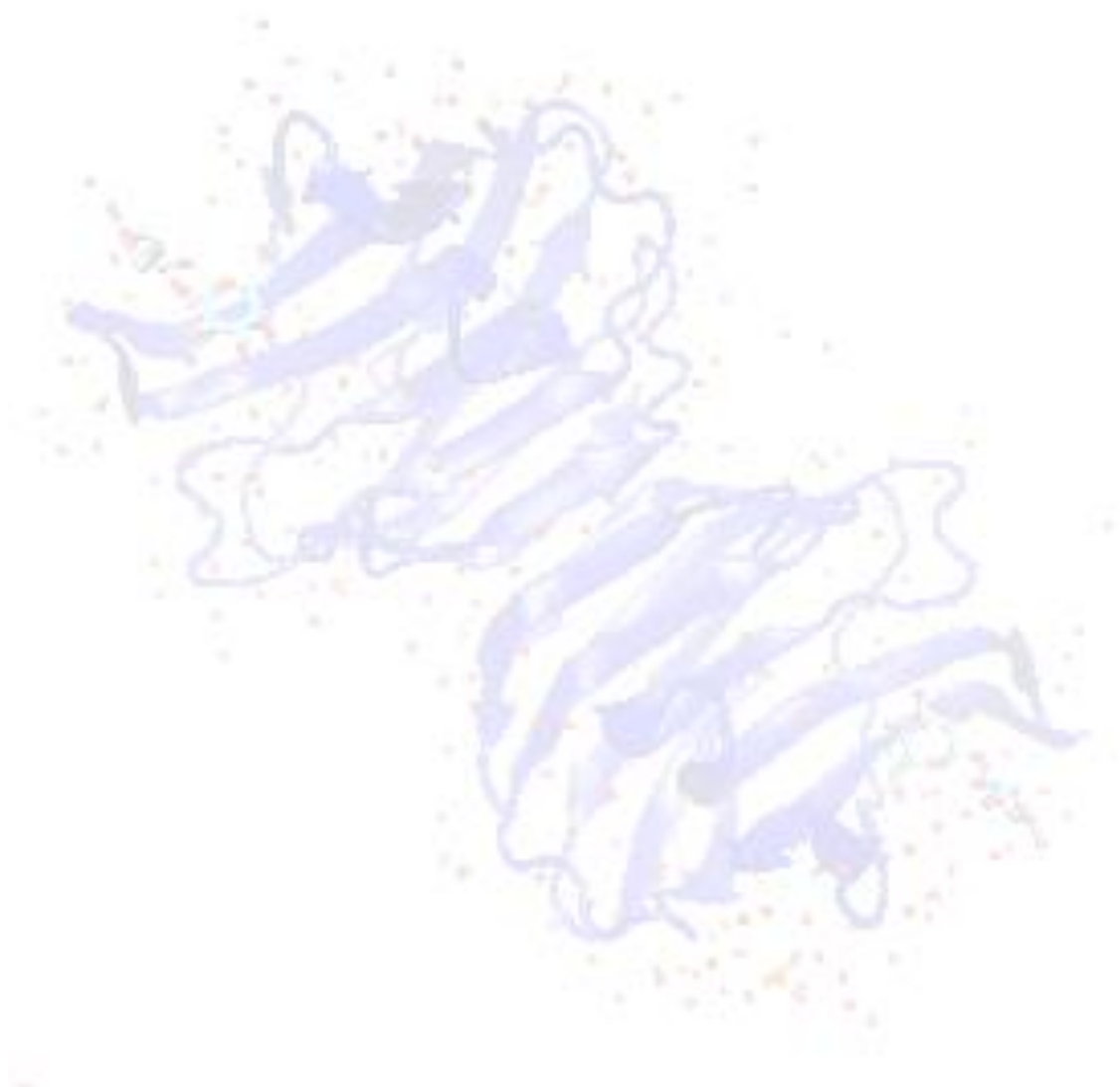
las galectinas, excepto para el compuesto **5**, como lo reflejan las energías de unión determinados por ensayo de docking, y también por ITC para el caso de hGal-1. Eso implicaría que los compuestos sintetizados enzimáticamente no presentarían mayor afinidad que los ligandos naturales. Sin embargo, los estudios de inhibición en fase sólida combinados con los estudios de docking permiten sacar algunas conclusiones respecto a algunos aspectos, particularmente en relación a la influencia de la estructura de los ligandos y su correspondiente afinidad con las galectinas. La presencia del grupo *N*-acetilo en la posición de 2 de la glucosa adyacente a la galactosa sería relevante para la afinidad. Por otro lado es favorable que el enlace glicosídico entre la galactosa y el monosacárido adyacente sea  $\beta$ -(1→4) o  $\beta$ -(1→3). Estos resultados van en sintonía con la presencia de unidades de LacNAc en los ligandos naturales reportados para las galectinas. Finalmente sería desfavorable la sustitución de un anillo de piranosa por un grupo aromático en el subsitio D.



## 5.4. BIBLIOGRAFÍA

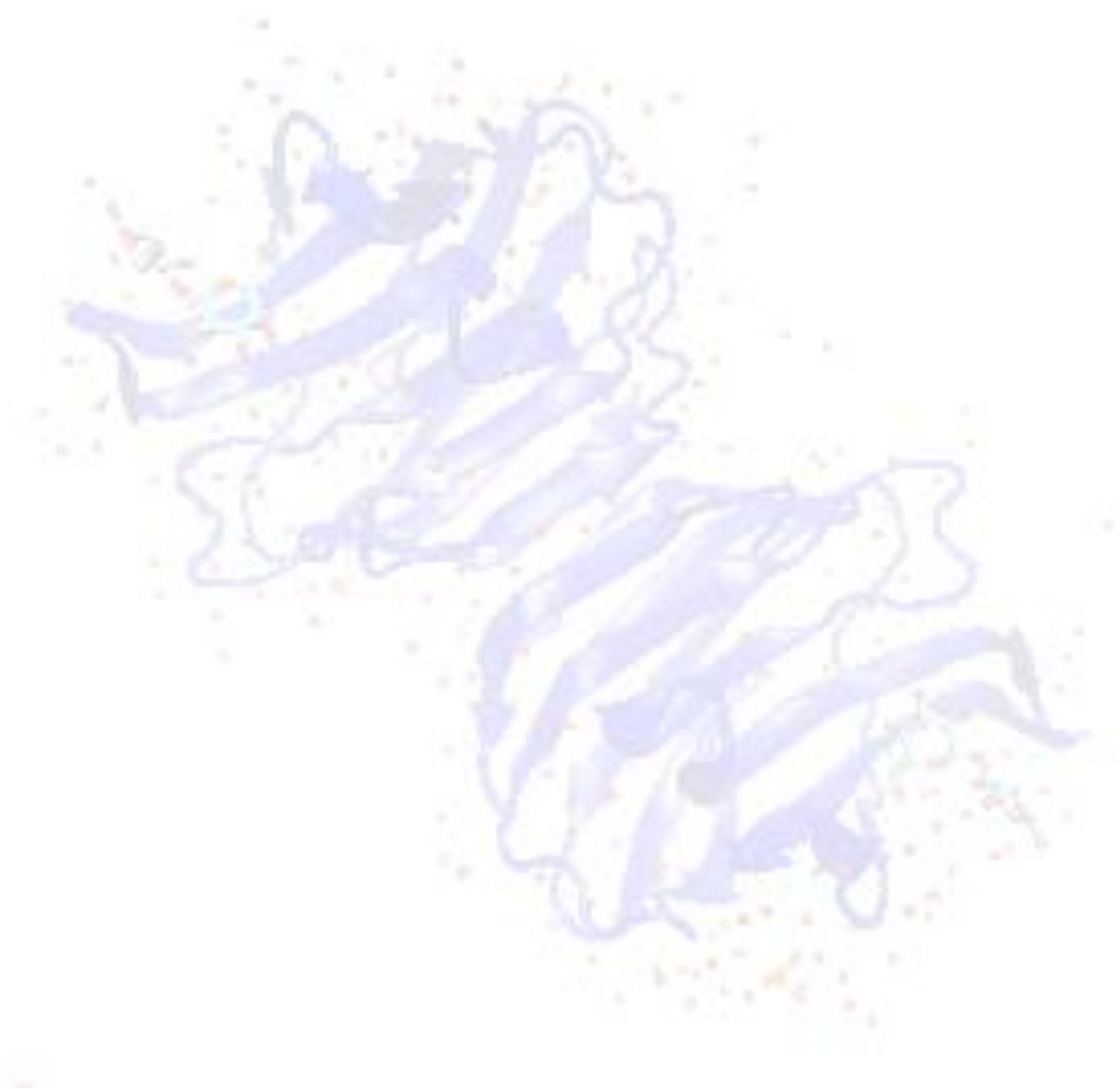
- (1) Audette, G. F.; Delbaere, L. T. J.; Xiang, J. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2003**, *4* (1), 11–20.
- (2) Rabinovich, G. A.; Toscano, M. A. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9* (5), 338–352.
- (3) Rabinovich, G. A.; Croci, D. O. *Immunity* **2012**, *36* (3), 322–335.
- (4) Di Lella, S.; Sundblad, V.; Cerliani, J. P.; Guardia, C. M.; Estrin, D. A.; Vasta, G. R.; Rabinovich, G. A. *Biochemistry* **2011**, *50* (37), 7842–7857.
- (5) Yang, R.-Y. Y.; Rabinovich, G. A.; Liu, F.-T. T. *Expert Rev. Mol. Med.* **2008**, *10* (17), 1–24.
- (6) Meynier, C.; Feracci, M.; Espeli, M.; Chaspoul, F.; Gallice, P.; Schiff, C.; Guerlesquin, F.; Roche, P. *Biophys. J.* **2009**, *97* (12), 3168–3177.
- (7) Sundblad, V.; Mathieu, V.; Kiss, R.; Rabinovich, G. a. *Galectins*, Second Edi.; Elsevier, 2013.
- (8) Meynier, C.; Guerlesquin, F.; Roche, P. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2009**, *27* (1), 49–57.
- (9) Oberg, C. T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Glycochemistry Today* **2011**, *65* (1), 1–5.
- (10) Kumari, M.; Sunoj, R. B.; Balaji, P. V. *Carbohydr. Res.* **2012**, *361*, 133–140.
- (11) Hsieh, T.-J.; Lin, H.-Y.; Tu, Z.; Huang, B.-S.; Wu, S.-C.; Lin, C.-H. *PLoS One* **2015**, *10* (5), e0125946.
- (12) Fortuna-Costa, A.; Gomes, A. M.; Kozłowski, E. O.; Stelling, M. P.; Pavão, M. S. G. *Front. Oncol.* **2014**, *4* (June), 1–9.
- (13) Green, E. D.; Adelt, G.; Baenziger, J. U.; Wilson, S.; Van Halbeek, H. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (34), 18253–18268.
- (14) Salomonsson, E.; Larumbe, A.; Tejler, J.; Tullberg, E.; Rydberg, H.; Sundin, A.; Khabut, A.; Frejd, T.; Lobsanov, Y. D.; Rini, J. M.; Nilsson, U. J.; Leffler, H. *Biochemistry* **2010**, *49* (44), 9518–9532.
- (15) Bernacki, R. J.; Bosmann, H. B. *Eur. J. Biochem.* **1973**, *33*, 49–58.
- (16) Rapoport, E. M.; Pochechueva, T. V; Kurmyshkina, O. V; Pazynina, G. V; Severov, V. V; Gordeeva, E. A.; Belyanchikov, I. M.; André, S.; Gabius, H.-J.; Bovin, N. V. *Biochemistry. (Mosc).* **2010**, *75* (3), 310–319.
- (17) Vokhmyanina, O. A.; Rapoport, E. M.; André, S.; Severov, V. V.; Ryzhov, I.; Pazynina, G. V.; Korchagina, E.; Gabius, H. J.; Bovin, N. V. *Glycobiology* **2012**, *22* (9), 1207–1217.
- (18) Dam, T. K.; Brewer, C. F. **2002**, *102* (718), 387–430.

- (19) Dam, T. K.; Gabius, H. J.; André, S.; Kaltner, H.; Lensch, M.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2005**, *44* (37), 12564–12571.
- (20) Ahmad, N.; Gabius, H. J.; Sabesan, S.; Oscarson, S.; Brewer, C. F. *Glycobiology* **2004**, *14* (9), 817–825.
- (21) Cagnoni, A. J.; Kovensky, J.; Uhrig, M. L. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (14), 6456–6467.
- (22) Jin, F.; Chammas, R.; Engel, J.; Reinhold, V. *Glycobiology* **1995**, No. Gm 45701, 157–158.
- (23) Wimmerova, M.; Kozmon, S.; Necasova, I.; Mishra, S. K.; Komárek, J.; Koca, J. *PLoS One* **2012**, *7* (10), 1–9.
- (24) Hsieh, T.-J.; Lin, H.-Y.; Tu, Z.; Lin, T.-C.; Wu, S.-C.; Tseng, Y.-Y.; Liu, F.-T.; Hsu, S.-T. D.; Lin, C.-H. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29457.
- (25) Chan, Y. C.; Lin, H. Y.; Tu, Z.; Kuo, Y. H.; Hsu, S. T. D.; Lin, C. H. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (2), 1–20.
- (26) Stowell, S. R.; Arthur, C. M.; Mehta, P.; Slanina, K. A.; Blixt, O.; Leffler, H.; Smith, D. F.; Cummings, R. D. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (15), 10109–10123.
- (27) Blidner, A. G.; Méndez-Huergo, S. P.; Cagnoni, A. J.; Rabinovich, G. A. *FEBS Lett.* **2015**, *589* (22), 3407–3418.
- (28) Nakahara, S.; Raz, A. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2008**, *8* (1), 22–36.





# **Capítulo 6:** **Consideraciones Finales**



## 6.1. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES

En esta tesis nos propusimos tres grandes objetivos:

- 1- Sintetizar distintos galacto-compuestos con potencial actividad inhibidora de galectina-1 y 3 humanas utilizando el sistema de transglicosilación catalizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.
- 2- Desarrollar modelos computacionales que permitieran analizar *in silico* las interacciones de las hGal-1 y hGal-3 y los ligandos sintetizados.
- 3- Validar el modelo teórico obtenido mediante la evaluación biológica *in vitro* de la interacción galectina-ligando.

Con respecto al primer objetivo, se logró exitosamente la síntesis de cuatro trisacáridos:  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**2**),  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**3**),  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (**4**);  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcNAcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-GlcNAcp (**6**) y un galactósido de carácter aromático bencil- $\beta$ -D-galactopiranosido (**5**), con rendimientos de purificación que variaron entre el 16 y el 47%. Estos resultados muestran la gran potencialidad de la enzima seleccionada para catalizar reacciones de transglicosilación utilizando como aceptores tanto azúcares como otras moléculas orgánicas como el alcohol bencílico. Se pone de manifiesto además, la regioselectividad de dicha  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* para la síntesis de glicósidos unidos mediante enlace  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) o  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), dependiendo del aceptor. Cuando el aceptor de grupo galactosilo fue lactosa o *N,N'*-diacetilquitobiosa, la única posición de galactosilación observada fue  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), mientras que cuando se trató de celobiosa se formó una mezcla de isómeros  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). La síntesis de compuestos de carácter aromático, se limitó al compuesto **5**. Otros aceptores estudiados como tirosina o dopamina, cuyos hidroxilos se encuentran unidos a un carbono del anillo aromático (i.e. fenólicos), no fueron galactosilados. Esto evidencia lo previamente reportado con respecto a la preferencia de las glicosidasas en general por los hidroxilos de carácter primario <sup>1</sup>.

Como parte del segundo objetivo de esta tesis se aplicaron distintas estrategias computacionales de Dinámica (DM) y Docking Molecular. Para ello fueron empleados distintos programas disponibles: MOE, Schrödinger, AUTODOCK y Gromacs. Por un

lado, mediante simulaciones de DM, se analizó la estabilidad de las interacciones entre las lectinas evaluadas y los ligandos co-cristalizados. Para ello se analizaron las distancias entre ciertos átomos del ligando (O3, O4 y O6 de la galactosa terminal) y los aminoácidos que participan en la interacción (His44, Arg48, His52, Asn61, Glu71 y Trp68 para hGal-1 y His144, Arg148, Asn174, Glu184 y Trp181 para hGal-3). La poca variación observada en dichas distancias, permitió confirmar las interacciones reportadas como clave para el reconocimiento entre residuo galactopiranosico y los aminoácidos del subsitio C y D de ambas galectinas.

A su vez a partir de las simulaciones en Gromacs de las galectinas en ausencia de ligando, se realizó un análisis de cluster con parte de la trayectoria, obteniendo distintas estructuras relajadas de las mismas. Las diferencias observadas en la posición de algunos aminoácidos clave involucrados en la interacción galectina-carbohidrato (ej. His52 en hGal-1, Trp181 en hGal-3), evidencia que la estructura cristalográfica no siempre es representativa de lo que pasa en disolución, lo cual es particularmente importante para estudios de actividad biológica (los cuales se realizan en disolución). Estos resultados demuestran la importancia de procesar las estructuras cristalográficas, en caso de ser posible, previo al desarrollo de otros cálculos.

Se emplearon dos estrategias computacionales para llevar a cabo los experimentos de docking molecular, por un lado utilizando Schrödinger y por otro AUTODOCK.

Se obtuvieron distintos modelos que lograron reproducir las poses reportadas en bibliografía para los ligandos lactosa y *N*-acetil-lactosamina. Además se obtuvieron distintas poses tanto para los ligandos sintetizados enzimáticamente, como para los comerciales seleccionados como de referencia (ligandos **1, 7, 8, 9, 10**) y cada una de las galectinas.

Finalmente, con el objetivo de validar los modelos teóricos obtenidos, se realizaron distintos ensayos biológicos *in vitro* (SPA e ITC) que permitieron comparar los resultados teóricos obtenidos con los datos experimentales. En función de los datos obtenidos, se puede observar que los modelos teóricos lograron reproducir razonablemente los resultados experimentales *in vitro*, respecto a la interacción entre los ligandos estudiados y las galectinas. Esto valida el modelo propuesto como



herramienta para predecir tanto las posibles interacciones como las tendencias en términos de energía libre de interacción.

Analizando los distintos modelos se puede apreciar que con el modelo obtenido en el programa Schrödinger se lograron obtener poses adecuadas (en las cuales el posicionamiento de la galactosa terminal es el adecuado), mientras que cuando se trabajó con AUTODOCK, esto fue posible solo para hGal-1. En el caso de hGal-3 este modelo no parece resultar adecuado ya que no se logran reproducir las poses características, ni los  $\Delta G_{\text{unión}}$  reportados para lactosa y *N*-acetil-lactosamina<sup>2,3</sup>. Sin embargo, esta estrategia de docking fue adecuada para estimar las energías de unión del complejo galectina-ligando ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) y compararlos con los obtenidos mediante ITC. Los  $\Delta G_{\text{unión}}$  demostraron una muy buena correlación con los resultados de energía libre obtenidos experimentalmente, validando así el modelo teórico obtenido para hGal-1.

A partir del análisis de interacciones galectina carbohidrato, queda claro que son diversos aspectos de la naturaleza química del ligando los que influyen en la interacción con la galectina. Por un lado la naturaleza del enlace entre la galactosa y el segundo azúcar es fundamental, siendo los enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) los que presentan mayor afinidad. Otro aspecto a tener en cuenta es la identidad de dicho azúcar, determinándose que la presencia del grupo *N*-acetilo en el carbono 2 del residuo glucopiranosico, mejora la interacción con el subsitio D de las galectinas, tanto 1 como 3. Finalmente, la adición de un tercer azúcar no resulta beneficioso respecto a la energía de unión. Esto no quiere decir que ligandos más grandes no puedan ser más afines por la galectina, sino que en principio estructuras de tipo trisacáridos no sería suficiente y no evidencian diferencias respecto a los disacáridos.

Los compuestos sintetizados no demostraron tener mayor afinidad por las galectinas que ligandos de referencia como lactosa o *N*-acetil-lactosamina. Sin embargo, el análisis de las interacciones entre dichos compuestos y las galectinas permitió establecer una correlación teórico-experimental, lo cual constituye un importante insumo para el diseño de nuevos inhibidores, generados a partir de los resultados obtenidos en la presente tesis.

Cabe destacar que parte de los resultados obtenidos en esta tesis fueron publicados en la revista *Carbohydrate Research*<sup>4</sup>.

## 6.2. PERSPECTIVAS

Consideramos importante destacar, que esta tesis tuvo un enfoque multidisciplinario, entre áreas como la bioquímica experimental, la química computacional y la elucidación estructural de carbohidratos.

Los galactocompuestos sintetizados en esta tesis no han logrado mejorar la afinidad de hGal-1 y hGal-3 respecto a sus ligandos naturales lactosa y *N*-acetil-lactosamina. Dado que la mayoría de ellos tiene la galactosa terminal unida por enlace  $\beta$ -(1→6) al monosacárido adyacente, que como ya fue discutido es menos favorable para la afinidad que el enlace  $\beta$ -(1→4), una alternativa sería la generación de galactocompuestos con enlace  $\beta$ -(1→4). Una posibilidad sería trabajar con  $\beta$ -galactosidasas con alta regioselectividad para la síntesis de enlaces  $\beta$ -(1→4), como la proveniente de *Bacillus circulans*<sup>5</sup>.

En acuerdo con nuestros resultados, se han reportado distintos galactósidos generados introduciendo diferentes sustituyentes en el carbono 1 de la galactosa, donde no se ha logrado un aumento en la afinidad<sup>6</sup>. Para todos los casos las constantes de afinidad son del orden de micromolar igual que para la lactosa o lactosamina. Sí se ha logrado la síntesis de ligandos con mayor afinidad para hGal-3 introduciendo distintos sustituyentes en el carbono tres de la galactosa o de la unidad de galactosa de la lactosa o lactosamina, donde se alcanzaron constantes de afinidad del orden de nanomolar<sup>7-9</sup>. Sin embargo estas modificaciones no se pueden realizar mediante estrategias enzimáticas utilizando glicosidasas que es una de las áreas de interés de nuestro grupo de trabajo.

Por otra parte en los últimos años se ha comenzado a trabajar en la síntesis de ligandos multiméricos basados en la generación de dendrímeros o neoglicoproteínas<sup>10,11</sup>. Existen glicoproteínas cuya composición glicosídica está bien estudiada como es el caso de la lactoferrina bovina. La misma presenta cinco sitios de glicosilación que contiene entre otros *N*-glicanos complejos, los cuales presentan unidades terminales de LacNAc sialiladas. Por lo cual si se desialila la lactoferrina exponiendo los residuos de LacNAc podríamos tener un multímero natural que sería interesante evaluar como

potencial inhibidor de galectinas. Además se podrían liberar los glicanos de la lactoferrina, tanto por métodos químicos como enzimáticos, y se podrían evaluar como inhibidores de galectinas.

Por otro lado y con el objetivo de mejorar los modelos obtenidos, sería interesante la incorporación de otras herramientas de docking molecular que posean mayor ajuste a carbohidratos, por ejemplo programas como AUTODOCK VINA<sup>12,13</sup> o VINA-CARB<sup>14</sup>.

Sería muy interesante también realizar simulaciones utilizando campos de fuerzas adecuados para los ligandos (como Glycam06<sup>15,16</sup> en el programa AMBER o CHARMM35 en el programa CHARMM<sup>17</sup>) con el objetivo de obtener complejos ligando-proteína representativos que asistan en la determinación de un modelo farmacofórico que permita determinar distintos requisitos estructurales que deben tener otros inhibidores.

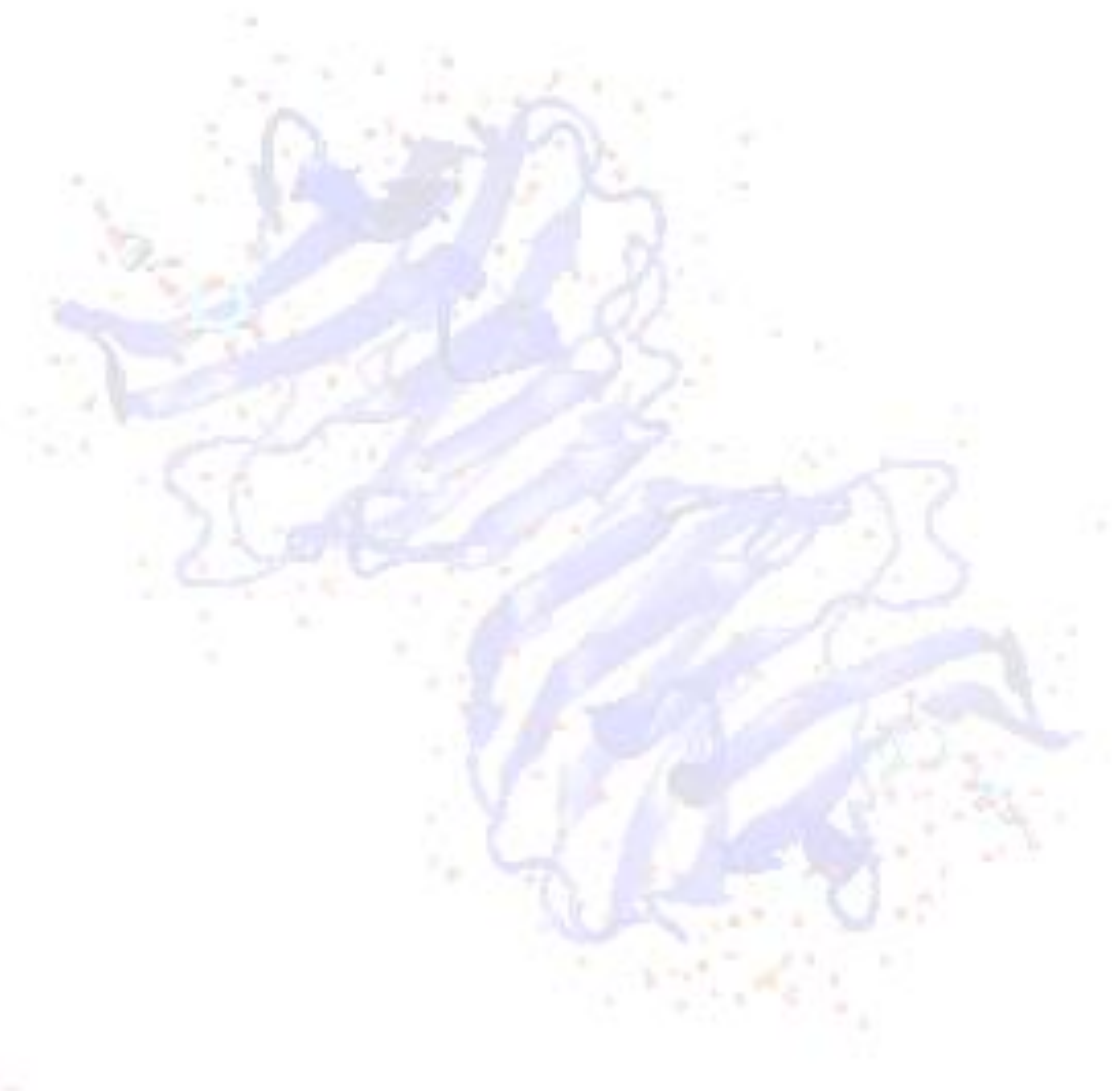
A su vez podrían estudiarse las interacciones entre las galectinas y sus glicanos naturales. A la fecha en que se terminó esta tesis, los reportes de estudios de interacción entre las galectinas y las glicoproteínas con las cuales interaccionan en la naturaleza (ej. laminina, fibronectina, integrinas), o al menos con sus glicanos enteros, son muy escasos. En este marco, hemos tenido algún resultado preliminar en el estudio mediante docking molecular de la interacción entre hGal-1 y los glicanos de la glicoproteína laminina.

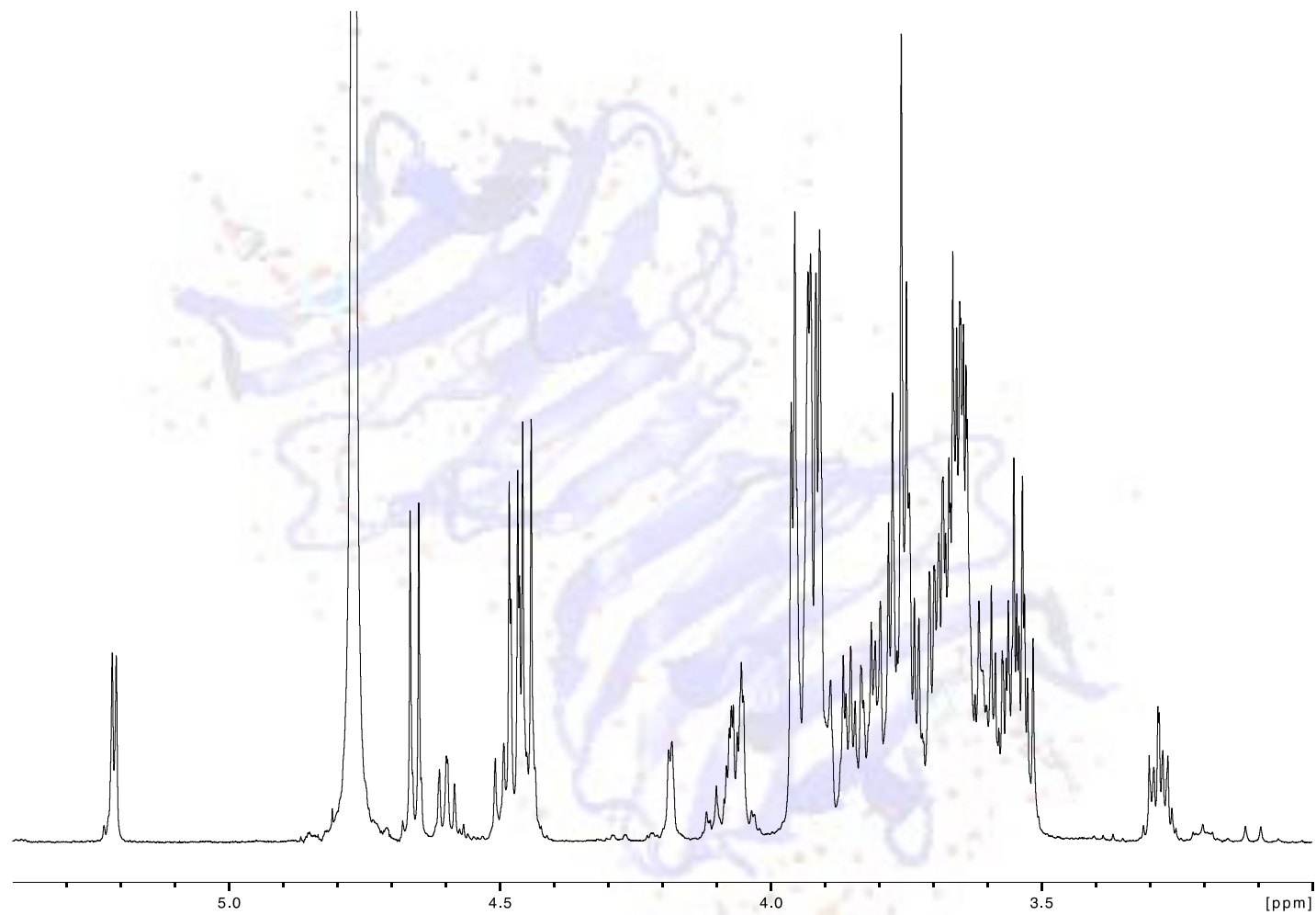
Finalmente, si bien hasta ahora los modelos desarrollados consideran al disolvente implícitamente, dado lo expuesto del DRC de las galectinas al mismo, sería importante analizar qué moléculas de agua están involucradas en la interacción galectina-ligando. De esta forma se podría obtener un modelo, cada vez más representativo de la realidad experimental. En este sentido hemos comenzado a analizar la distribución de moléculas de agua en el DRC, empleando el programa WATCLUST<sup>18</sup> y utilizando como punto de partida una trayectoria de 200 ns. De esta forma, es posible analizar los sitios dónde se localizarían moléculas de agua (con rigurosidad estadística) y cómo estas interacciones se pueden capitalizar para diseño de inhibidores de galectinas más eficientes.

### 6.3. BIBLIOGRAFÍA

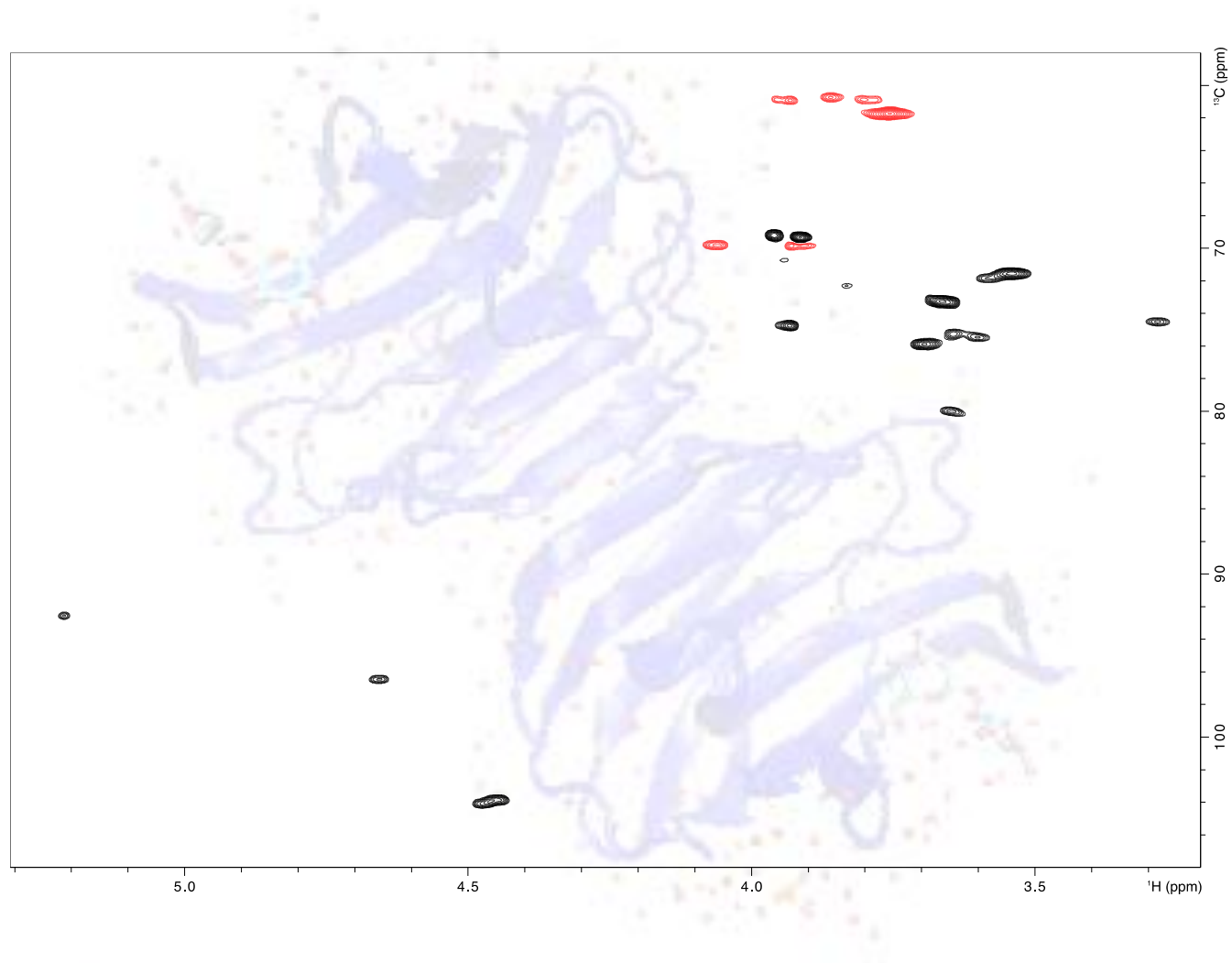
- (1) Faber, K. *Biotransformations aid organic chemists*, 6th ed.; Springer, Ed.; Berlin, 2011.
- (2) Cagnoni, A. J.; Kovensky, J.; Uhrig, M. L. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (14), 6456–6467.
- (3) Brewer, C. F. *Glycoconj. J.* **2004**, *19* (7–9), 459–465.
- (4) Porciúncula González, C.; Cagnoni, A. J.; Mariño, K. V.; Fontana, C.; Saenz-Méndez, P.; Irazoqui, G.; Giacomini, C. *Carbohydr. Res.* **2019**, *472* (August 2018), 1–15.
- (5) Porciuncula González, C.; Giacomini, C.; Irazoqui, G. In *Beta-galactosidase: Properties, structure and functions*; Eloy Kras, Ed.; Nova Science Publishers, Inc: New York, 2019; pp 65–115.
- (6) Blanchard, H.; Bum-Erdene, K.; Bohari, M. H.; Yu, X. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**.
- (7) Salameh, B. A.; Cumpstey, I.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J. *Bioorganic Med. Chem.* **2010**, *18* (14), 5367–5378.
- (8) Giguère, D.; Bonin, M. A.; Cloutier, P.; Patnam, R.; St-Pierre, C.; Sato, S.; Roy, R. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, *16* (16), 7811–7823.
- (9) Delaine, T.; Collins, P.; Mackinnon, A.; Sharma, G.; Stegmayr, J. *Chembiochem* **2016**.
- (10) Bojarová, P.; Kren, V. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 1142–1160.
- (11) Laaf, D.; Bojarová, P.; Elling, L.; Vladimír, K. *Trends Biotechnol.* **2018**, 1–14.
- (12) Seeliger, D.; de Groot, B. L. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24* (5), 417–422.
- (13) Trott, O.; Olson, A. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461.
- (14) Nivedha, A. K.; Thieker, D. F.; Makeneni, S.; Hu, H.; Woods, R. J. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (2), 892–901.
- (15) Woods, R. J.; Tessier, M. B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 575–583.
- (16) Kirschner, K.; Yongye, A.; Tschampel, S.; González-Outeiriño, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2015**, *29* (4), 622–655.
- (17) Guvench, O.; Greenr, S. N.; Kamath, G.; Brady, J. W.; Venable, R. M.; Pastor, R. W.; Mackerell, A. D. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (15), 2543–2564.
- (18) López, E. D.; Arcon, J. P.; Gauto, D. F.; Petruk, A. A.; Modenutti, C. P.; Dumas, V. G.; Marti, M. A.; Turjanski, A. G. *Bioinformatics* **2015**, *31* (22), 3697–3699.





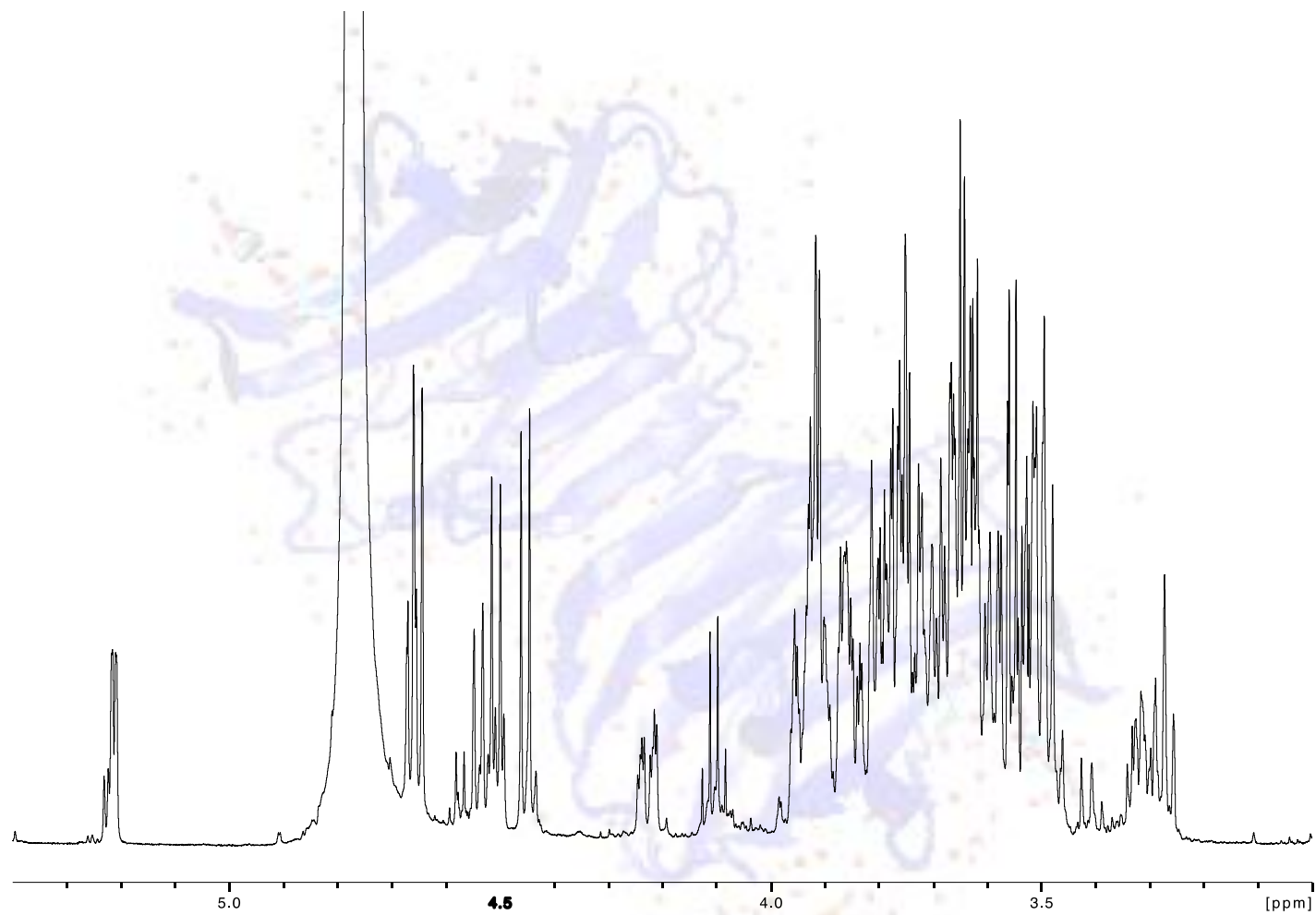


**Figura A.3.1** Espectro  $^1\text{H}$  NMR de  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (2).

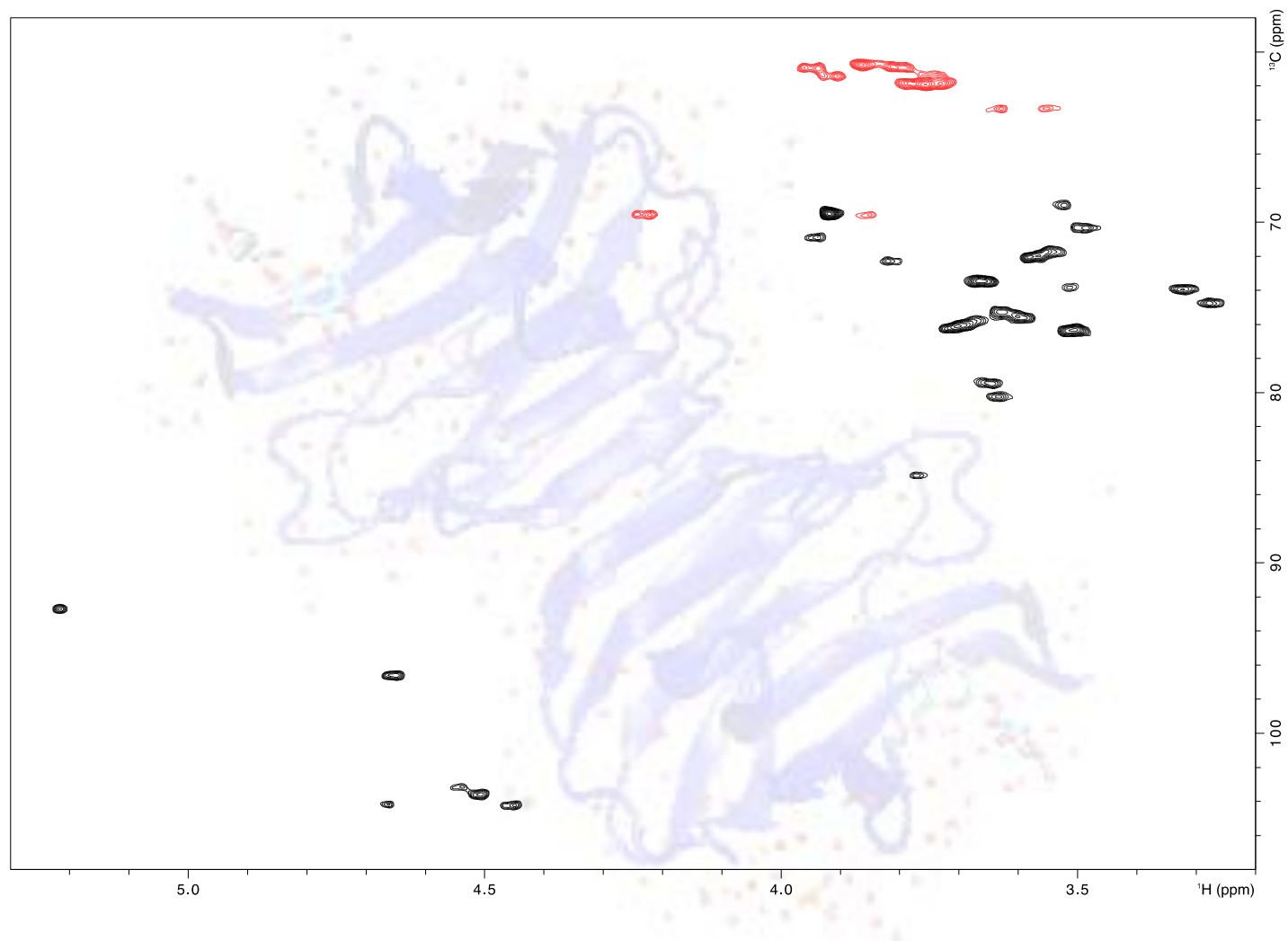


**Figura A.3.2.** Espectro  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC de  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp (2)$ .





**Figura A.3.3.** Espectro  $^1\text{H}$  NMR de la mezcla de trisacáridos  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (3) y  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (4).



**Figura A.3.4.** Espectro  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC de la mezcla de trisacáridos  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (**3**) and  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (**4**).

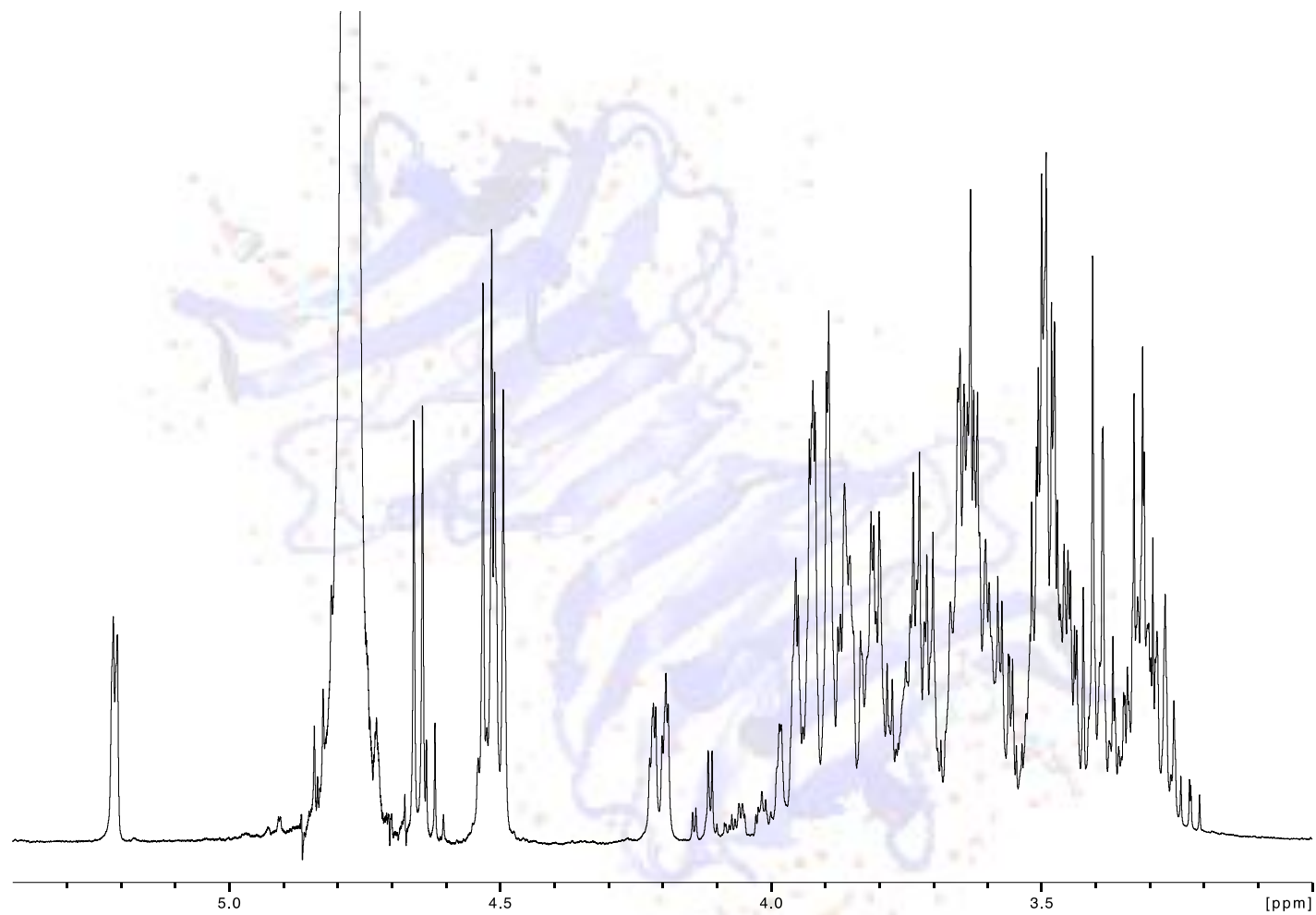


Figura A.3.5. Espectro <sup>1</sup>H NMR del trisacárido  $\beta$ -D-Glcp-(1→6)- $\beta$ -D-Glcp-(1→4)-D-Glcp (11).

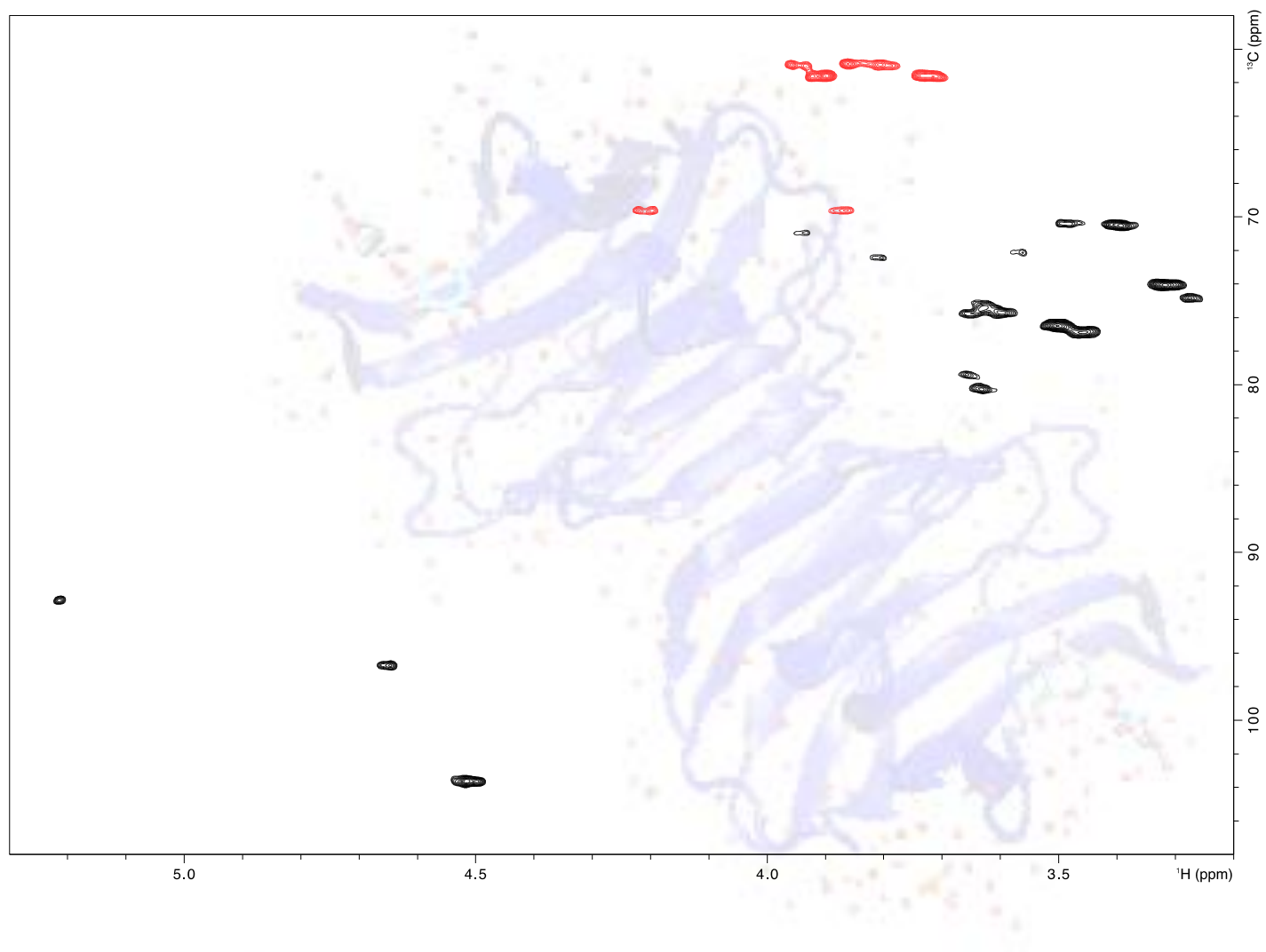
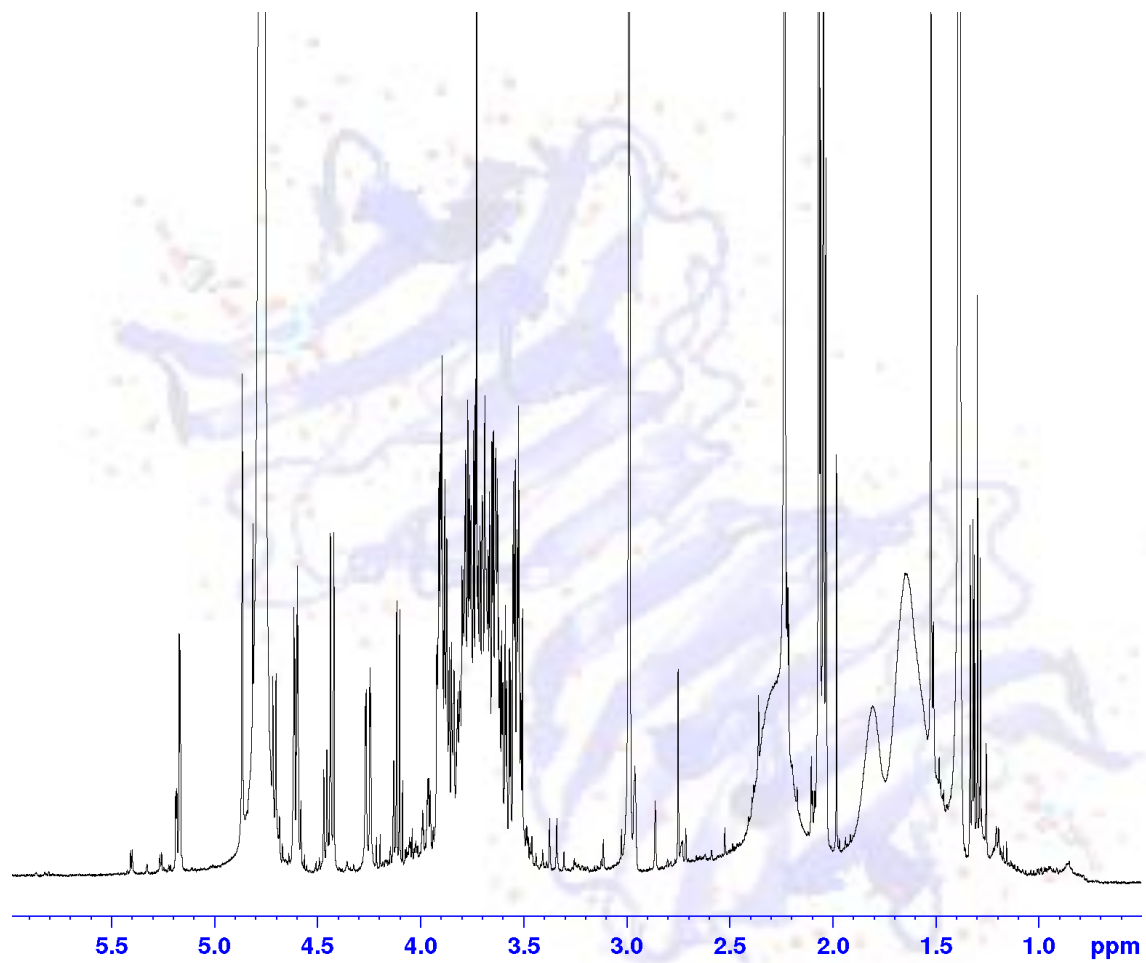
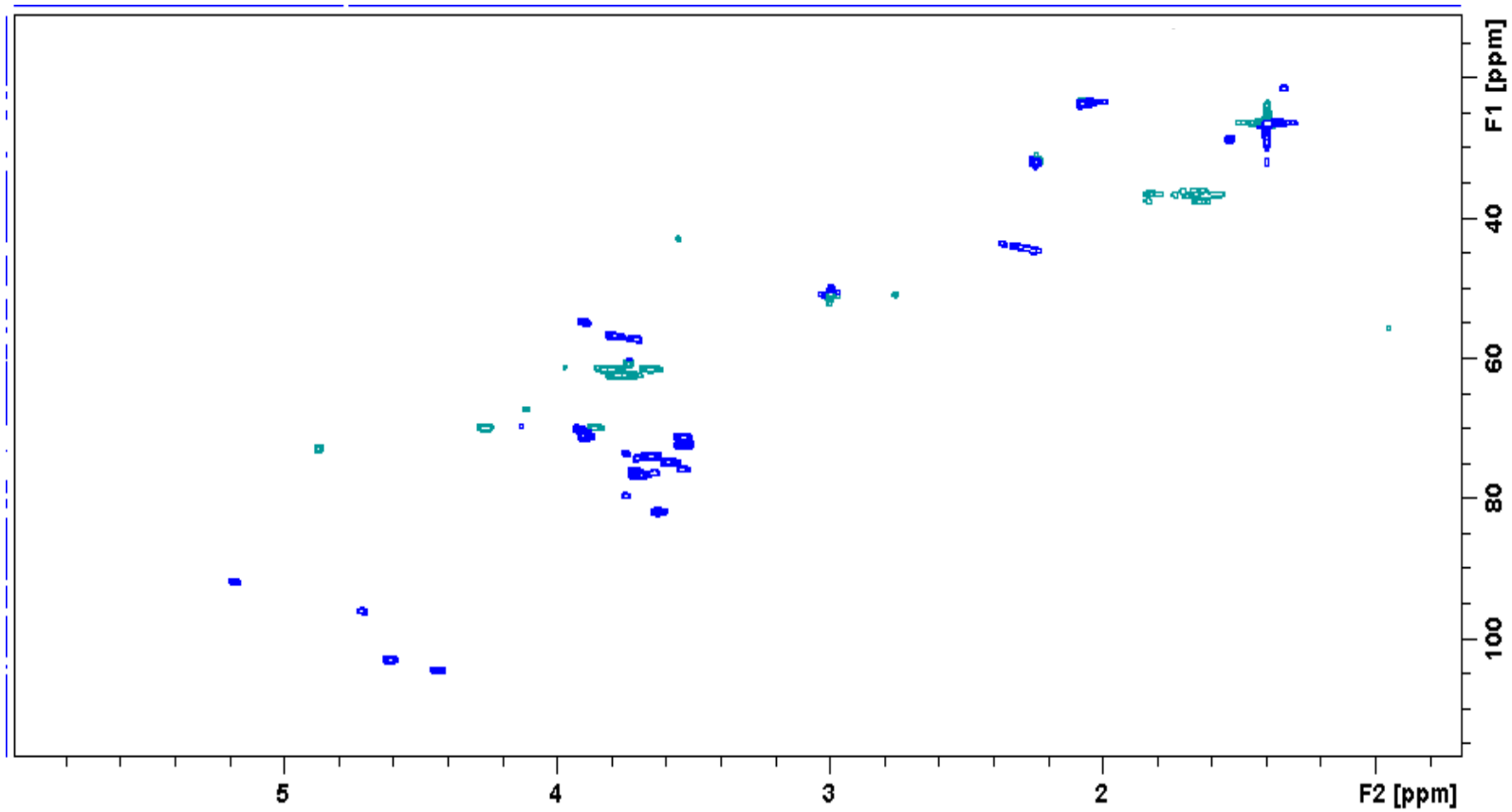


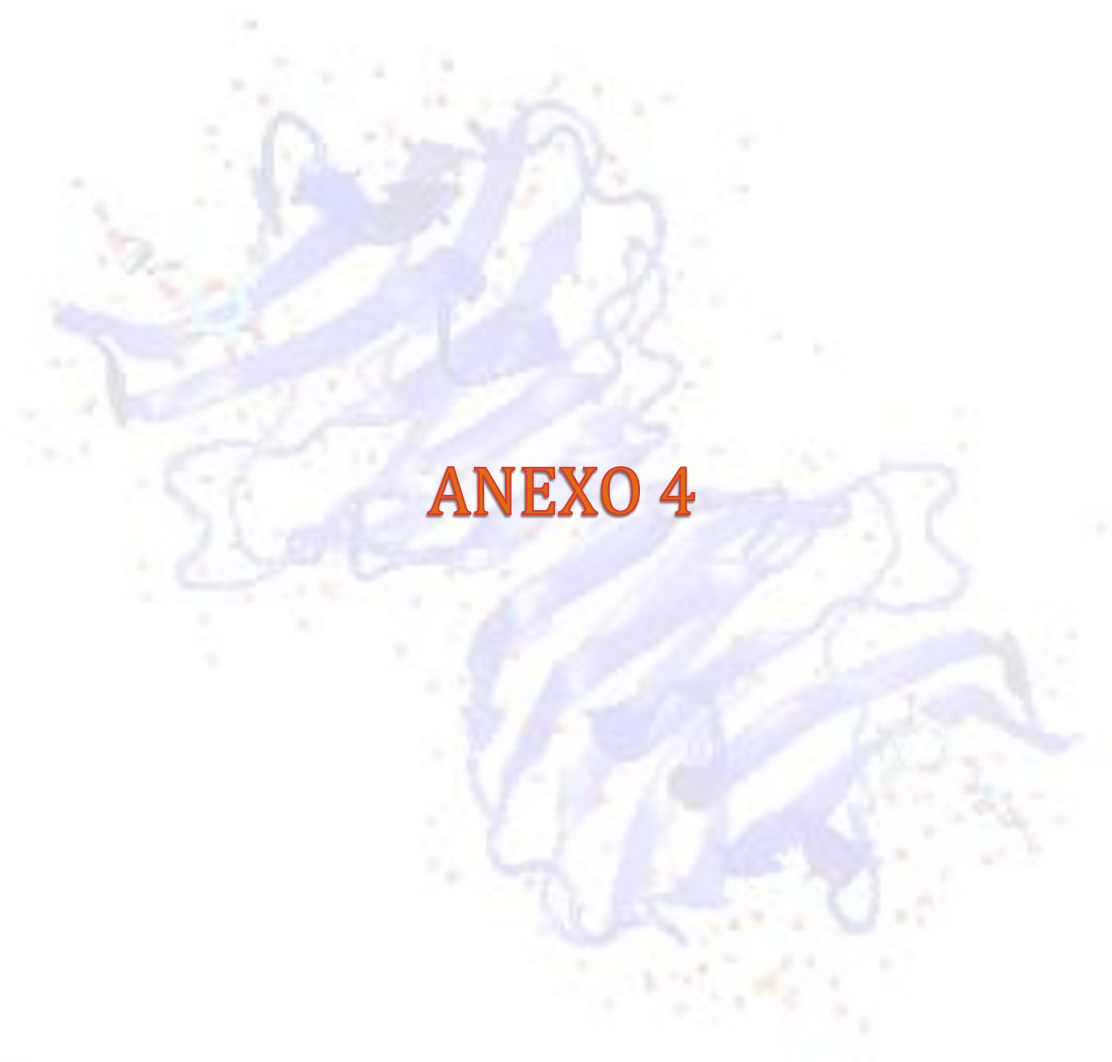
Figura A.3.6. Espectro  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC del trisacárido  $\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (11).

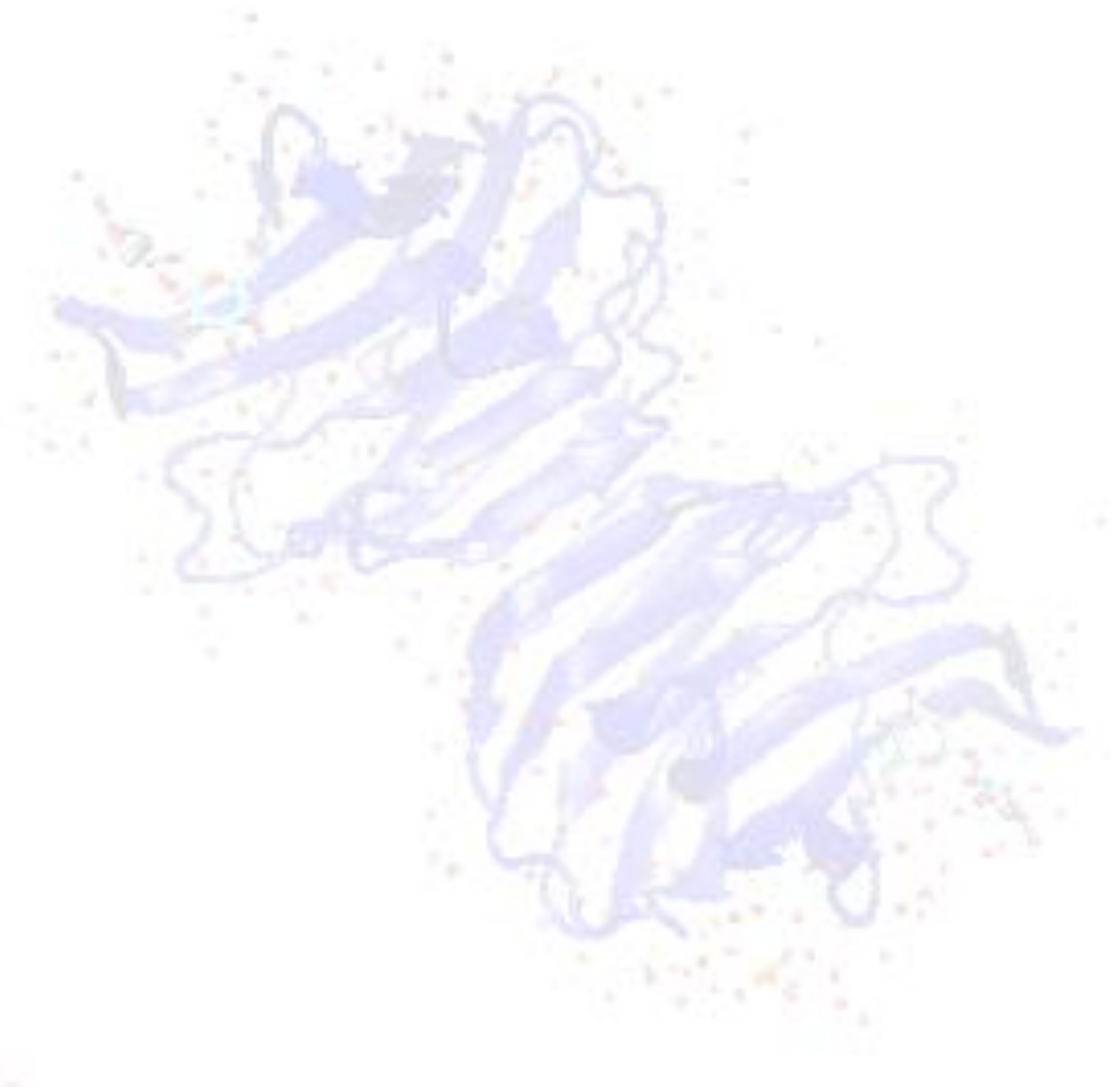


**Figura A.3.7.** Espectro  $^1\text{H}$  NMR del trisacárido  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-GlcNAcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-GlcNAcp}$  (6).

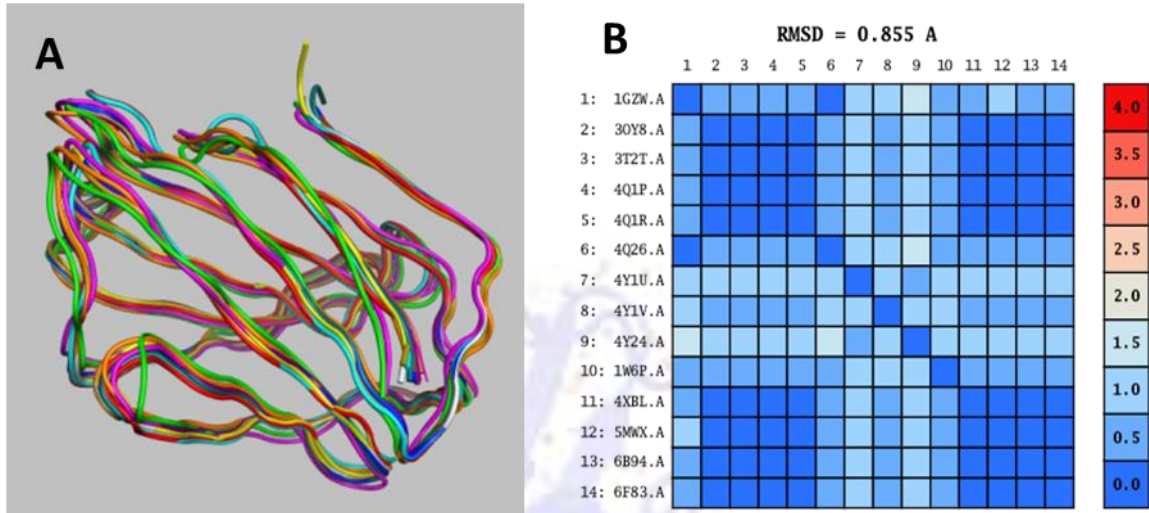


**Figura A.3.8.** Espectro  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC del trisacárido  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-GlcNAcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-GlcNAcp}$  (**6**).

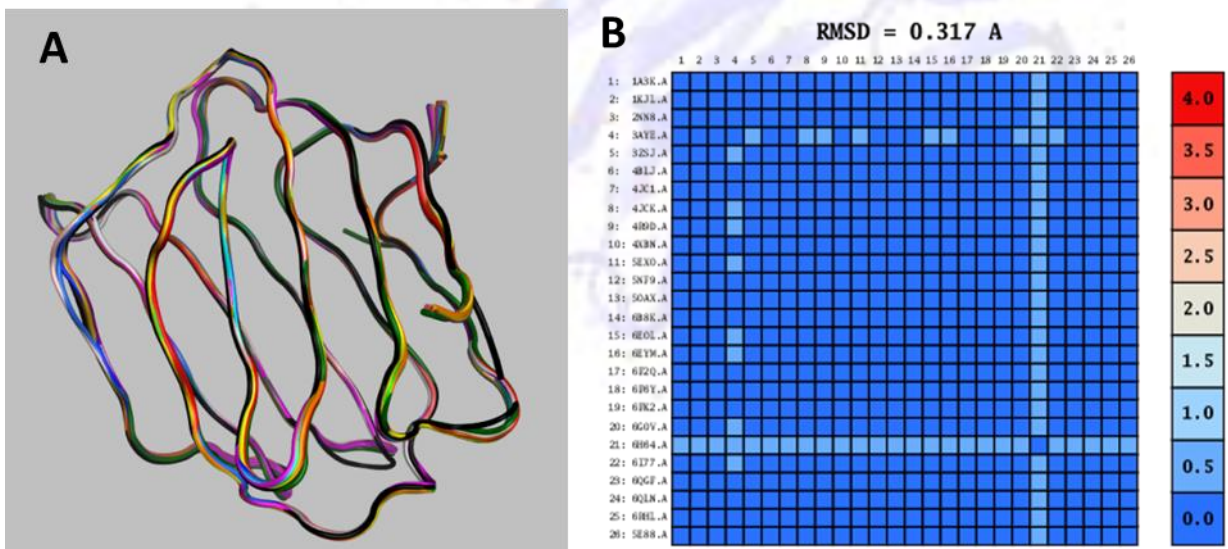








**Figura A.4.1.** A) Estructuras cristalográficas superpuestas correspondientes a galectina-1 humana seleccionadas. B) cálculo de RMSD.



**Figura A.4.2.** A) Estructuras cristalográficas superpuestas correspondientes a galectina-3 seleccionadas y superpuestas. B) Cálculo de RMSD.

A.4.3. Dinámica Molecular hGal1 (AMBER99)

His44 Ne – GalO4

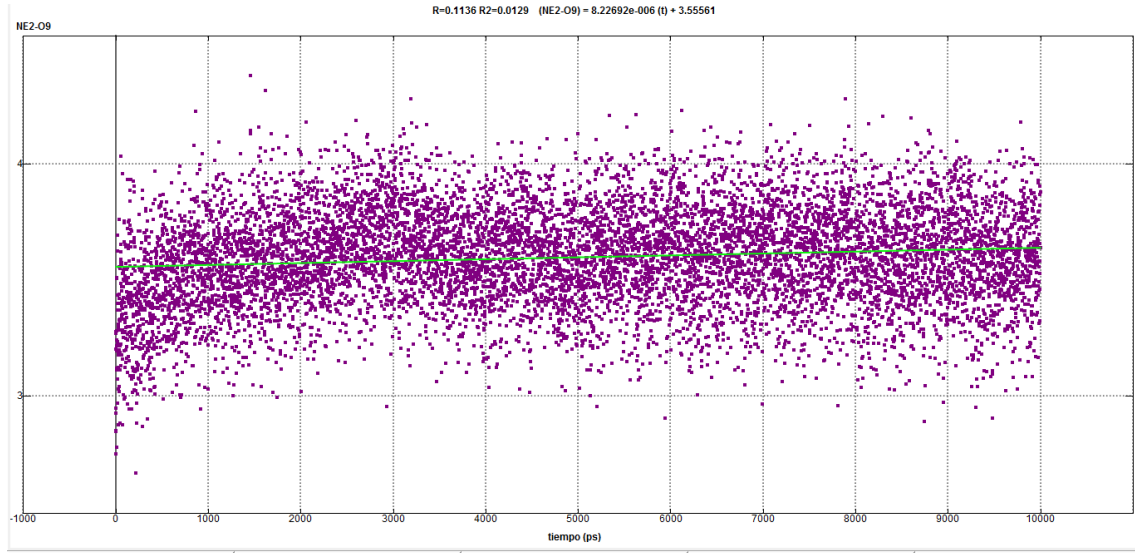


Figura A.4.3.1. Distancia His44 Ne – GalO4

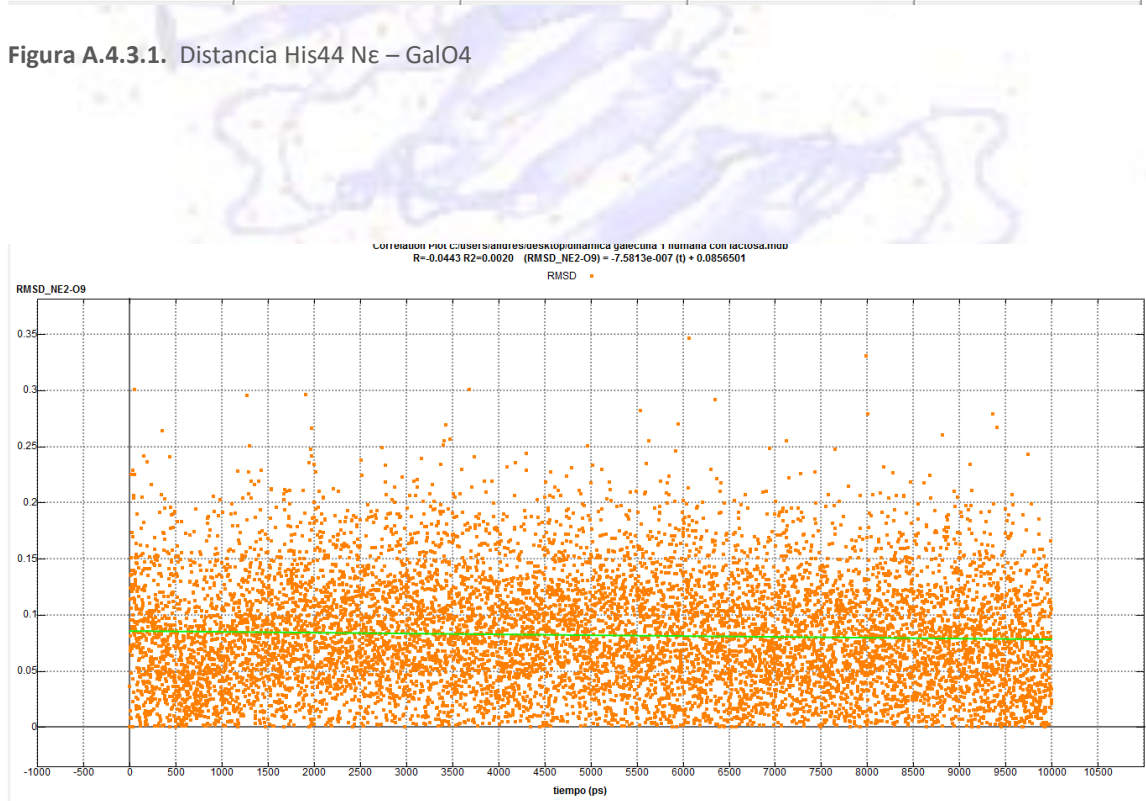


Figura A.4.3.2. RMSD His44 Ne – GalO4

### Arg48 NH2 – GalO4

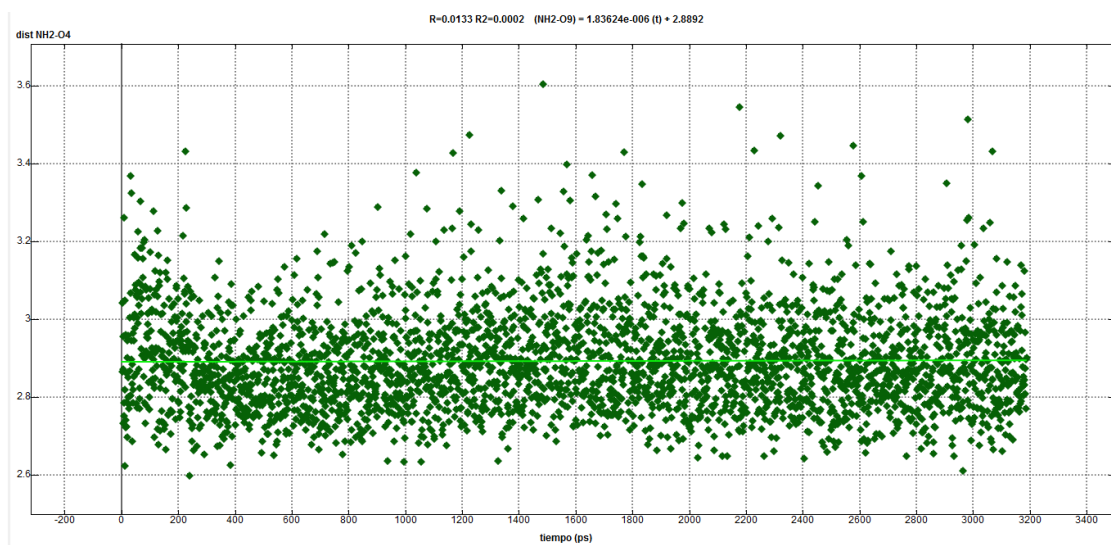


Figura A.4.3.3. Distancia Arg48 NH2 – GalO4

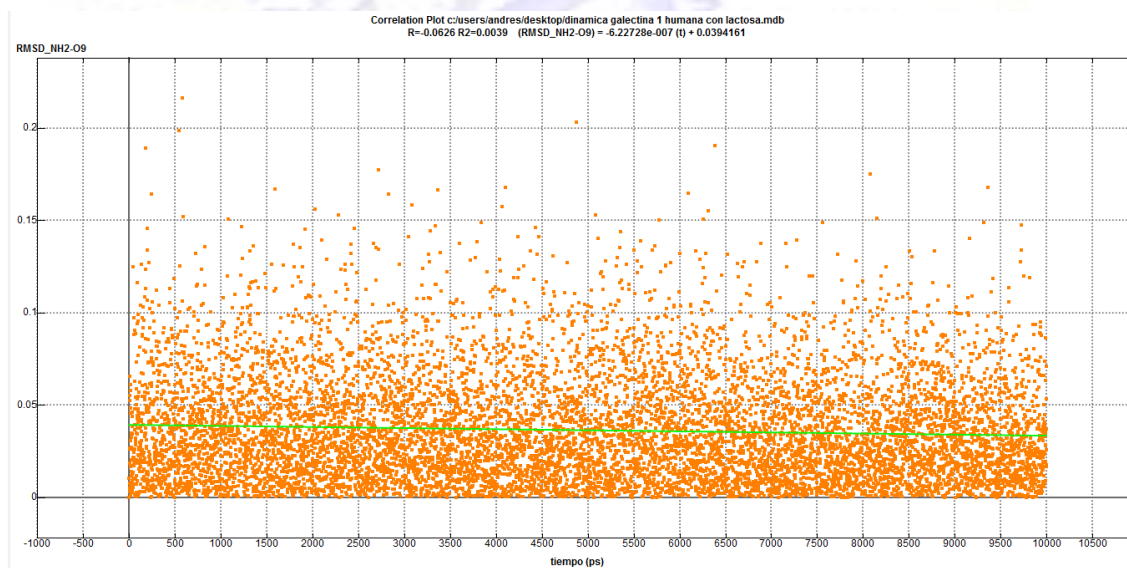


Figura A.4.3.4. RMSD Arg48 NH2 – GalO4

### His52 N $\delta$ 1 – GalO2

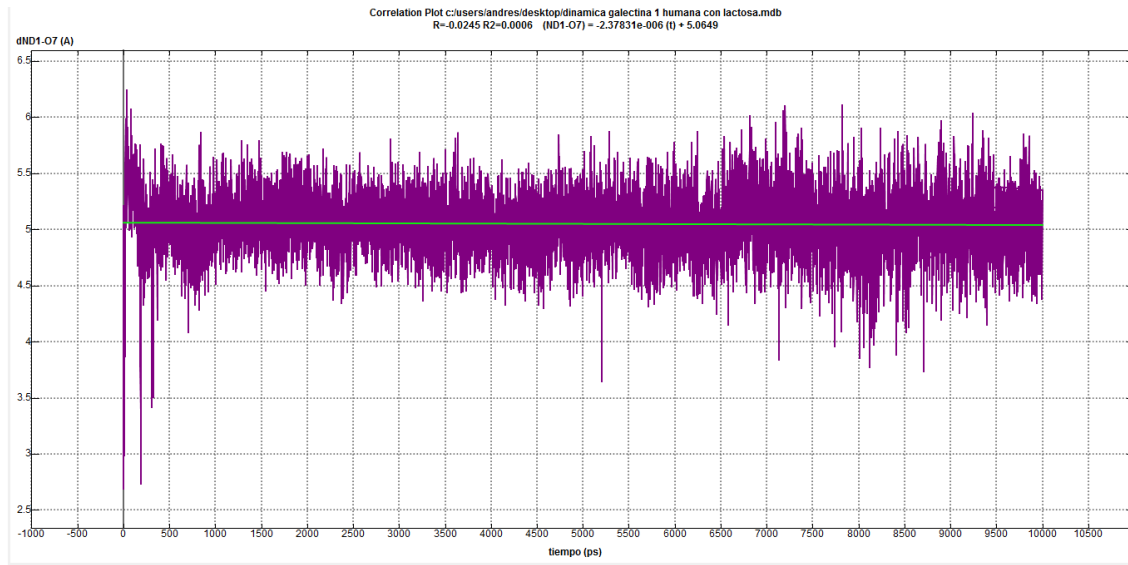


Figura A.4.3.5. Distancia His52 N $\delta$ 1 – GalO2

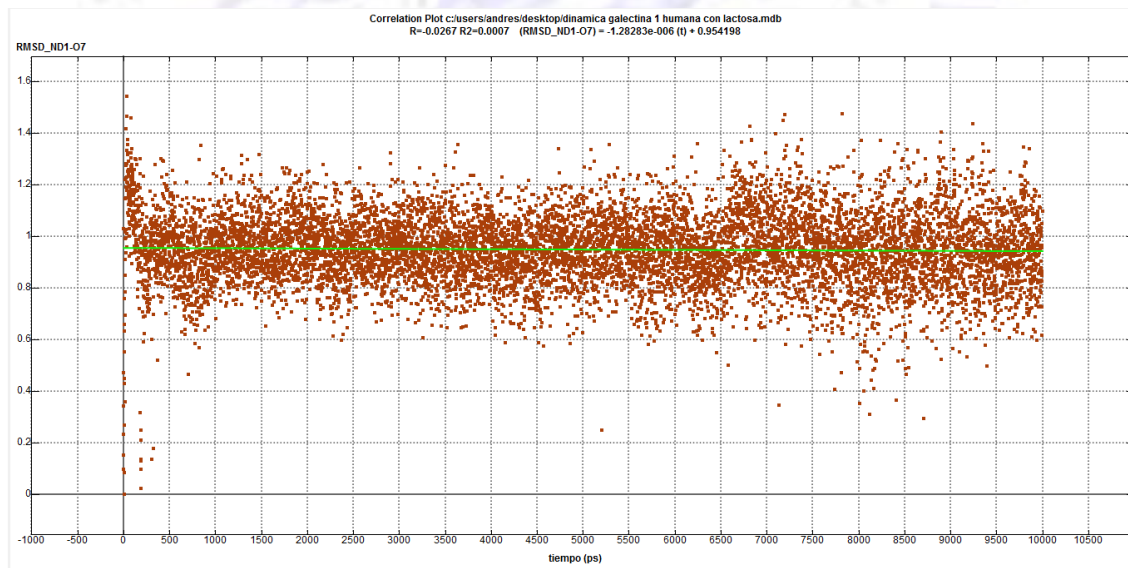


Figura A.4.3.6. RMSD His52 N $\delta$  – Gal O2

Asn61 Oδ – GalO6

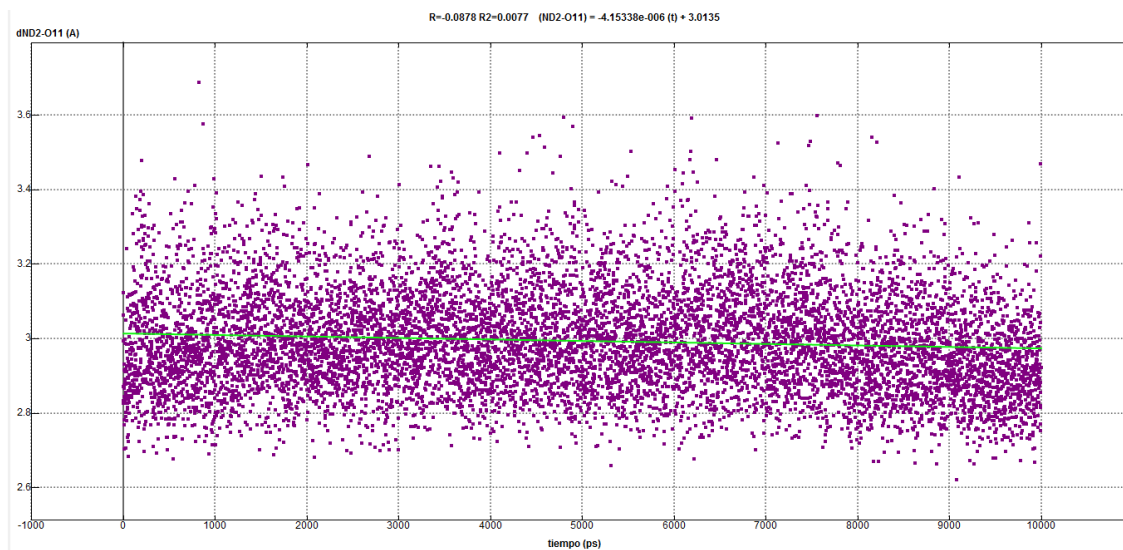


Figura A.4.3.7. Distancia Asn61 Oδ – GalO6

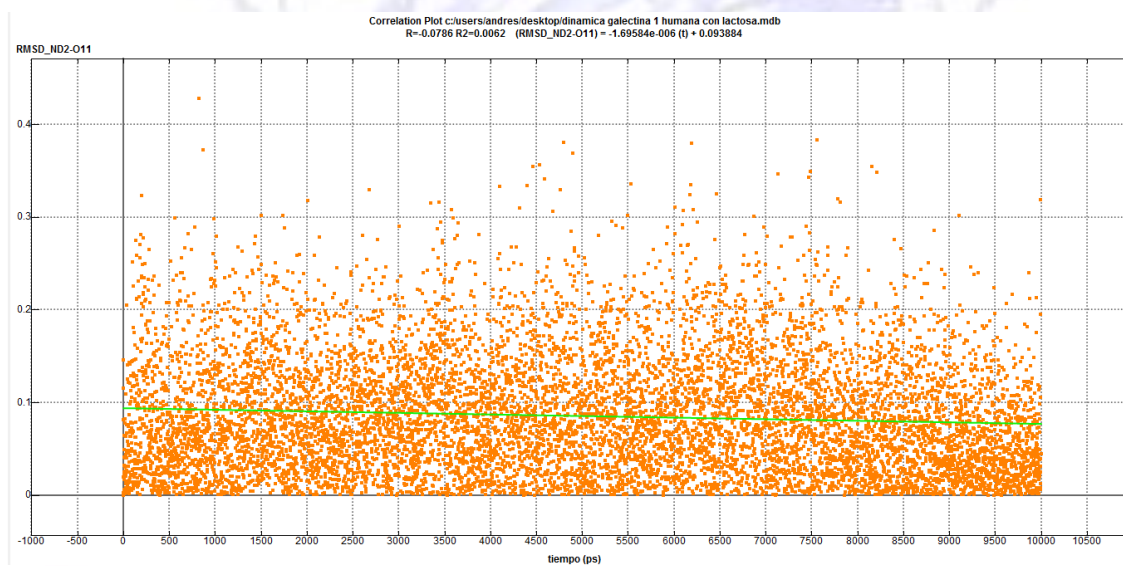
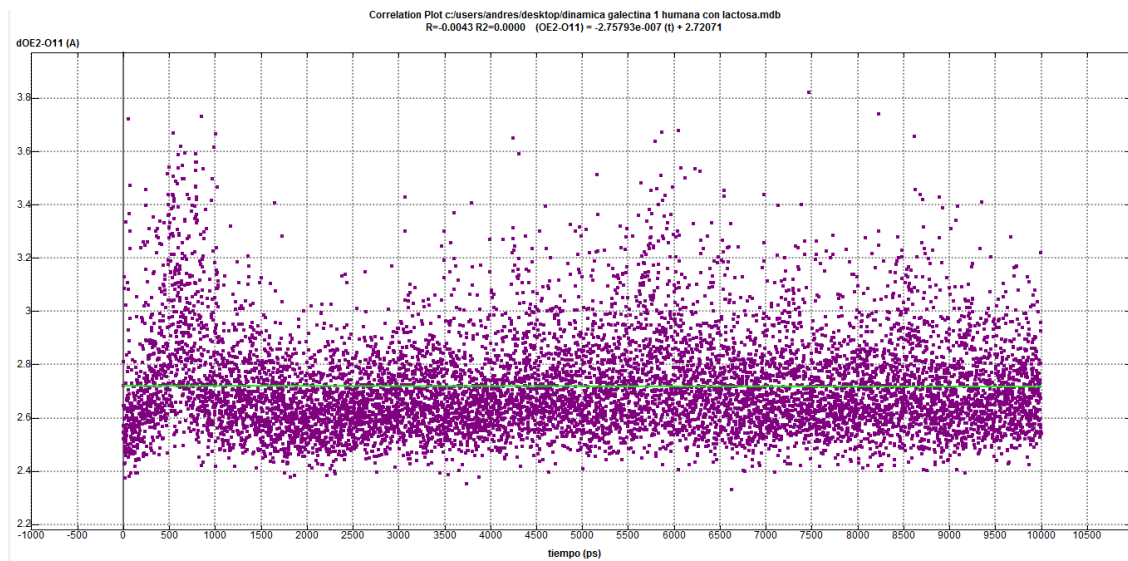
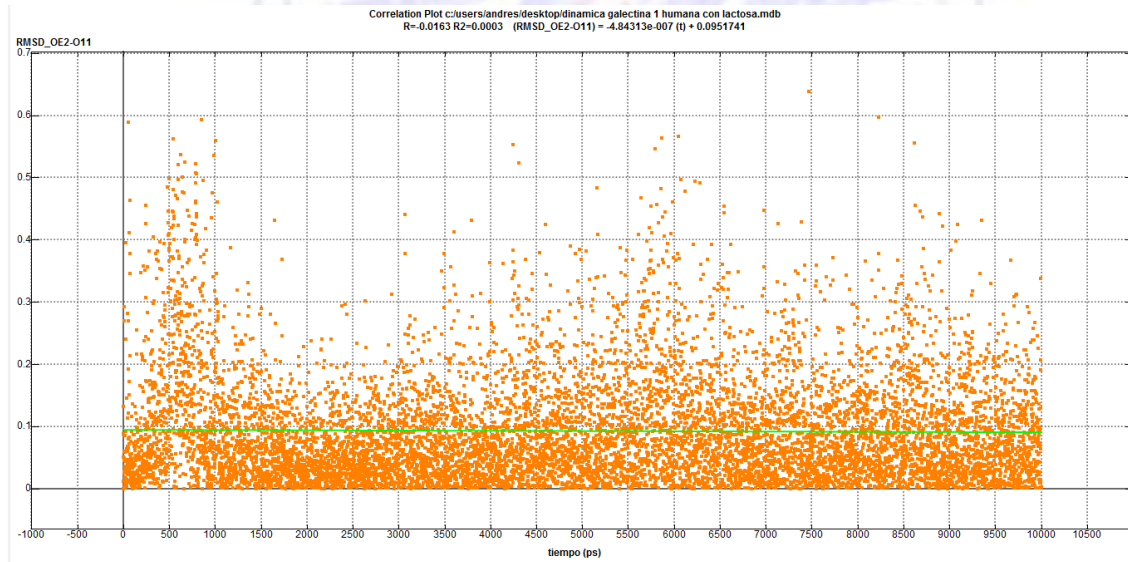


Figura A.4.3.8. RMSD Asn61 Oδ – GalO6

**Glu71 Oε2 – GalO6**



**Figura A.4.3.9.** Distancia Glu71 Oε2 – GalO6



**Figura A.4.3.10.** RMSD Glu71 Oε2 – GalO6

Trp68 Nε – GalO3

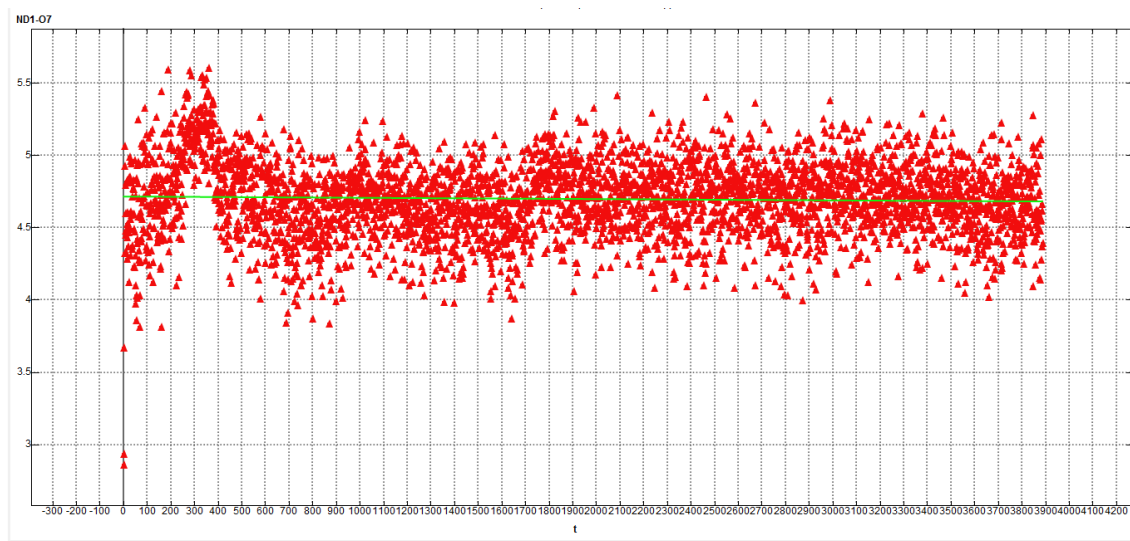


Figura A.4.3.11. Distancia Trp68 Nε – GalO3

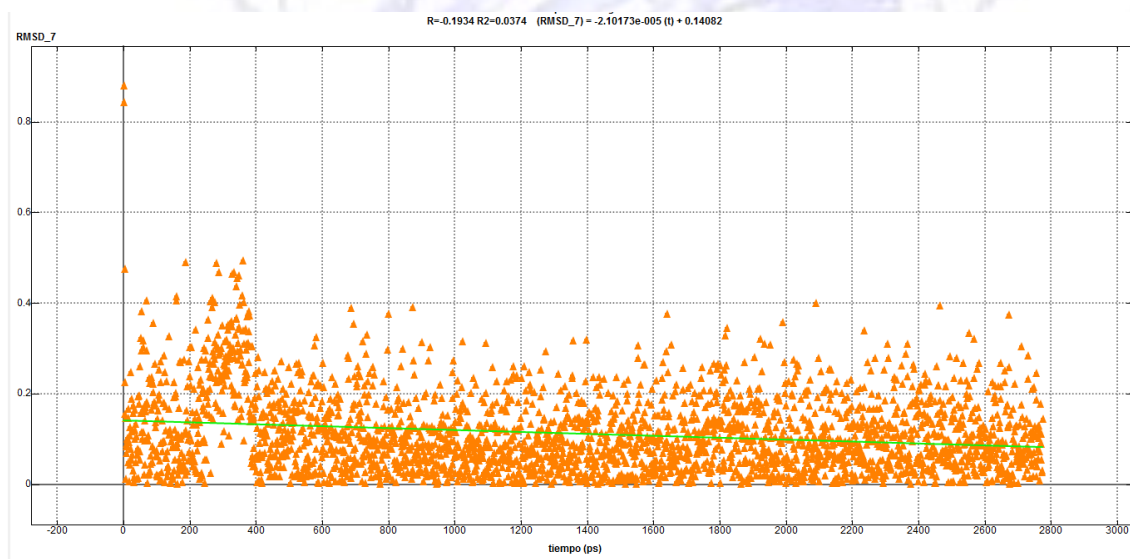


Figura A.4.3.12. RMSD Trp68 Nε – GalO3

### Diedro H1-C1-O4-C4

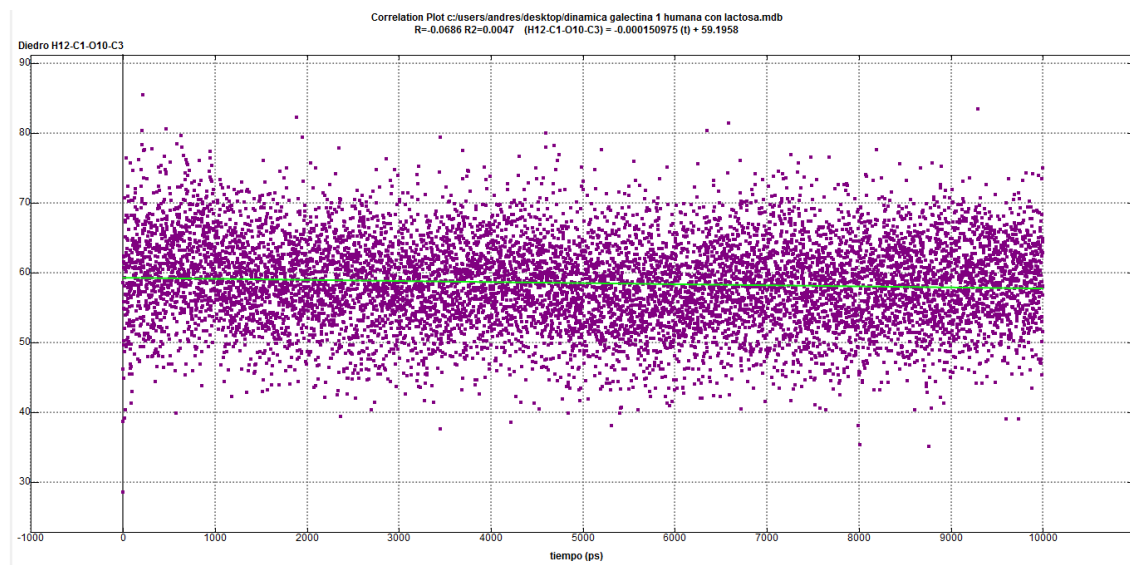


Figura A.4.3.13. Diedro H1-C1-O4-C4

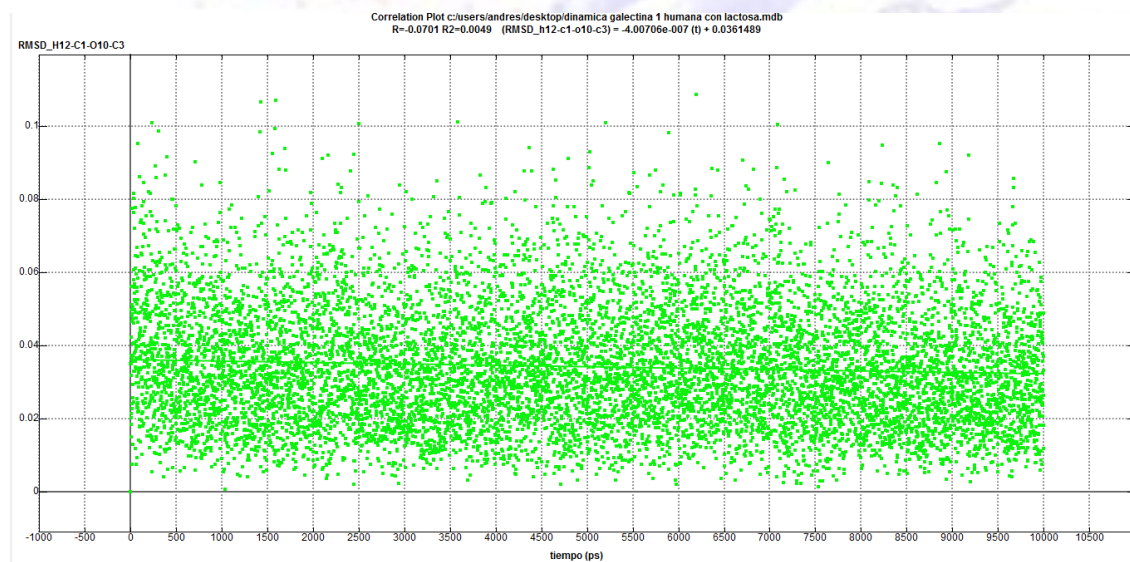


Figura A.4.3.14. RMSD Diedro H1-C1-O4-C4



### Diedro C1-O4-C4-H4

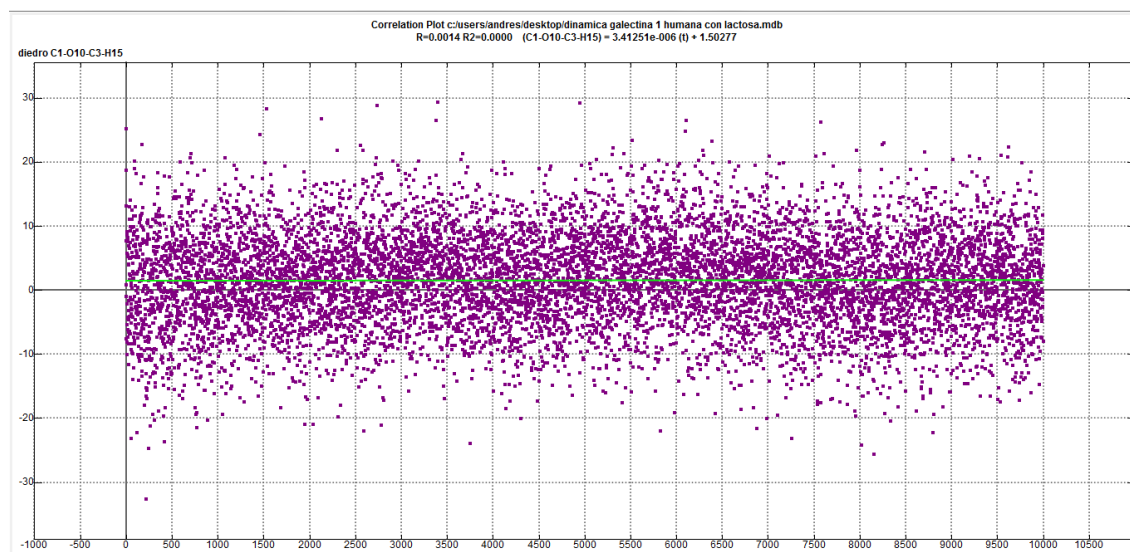


Figura A.4.3.15. Diedro C1-O4-C4-H4

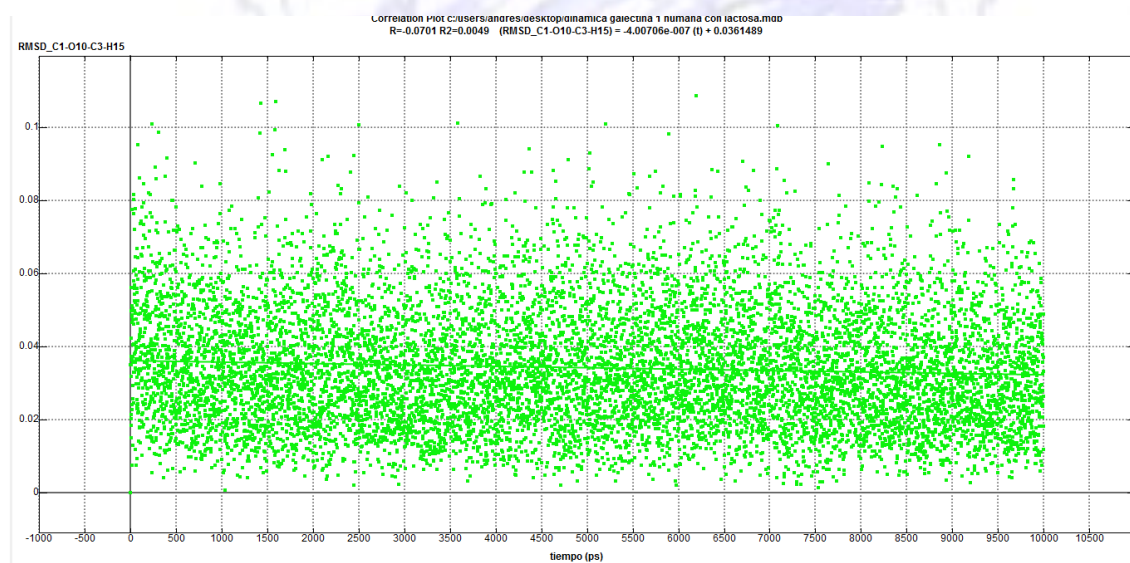


Figura A.4.3.16. RMSD Diedro C1-O4-C4-H4

### A.4.4. Dinámica Molecular hGal-3 (AMBER99)

#### His158 Nε – GalO4

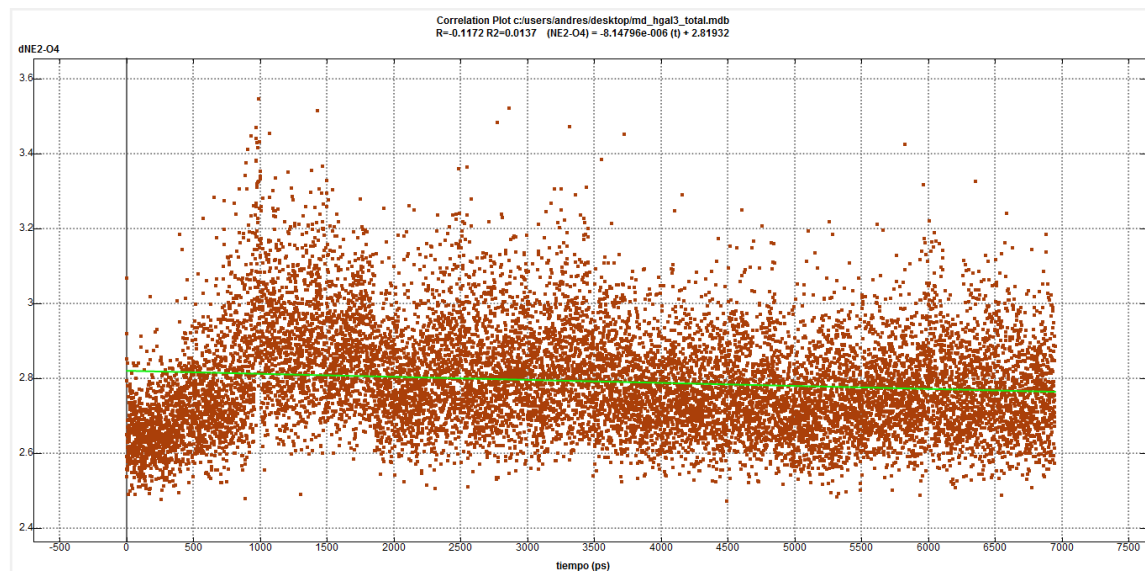


Figura A.4.4.1. Distancia His158 Nε – GalO4

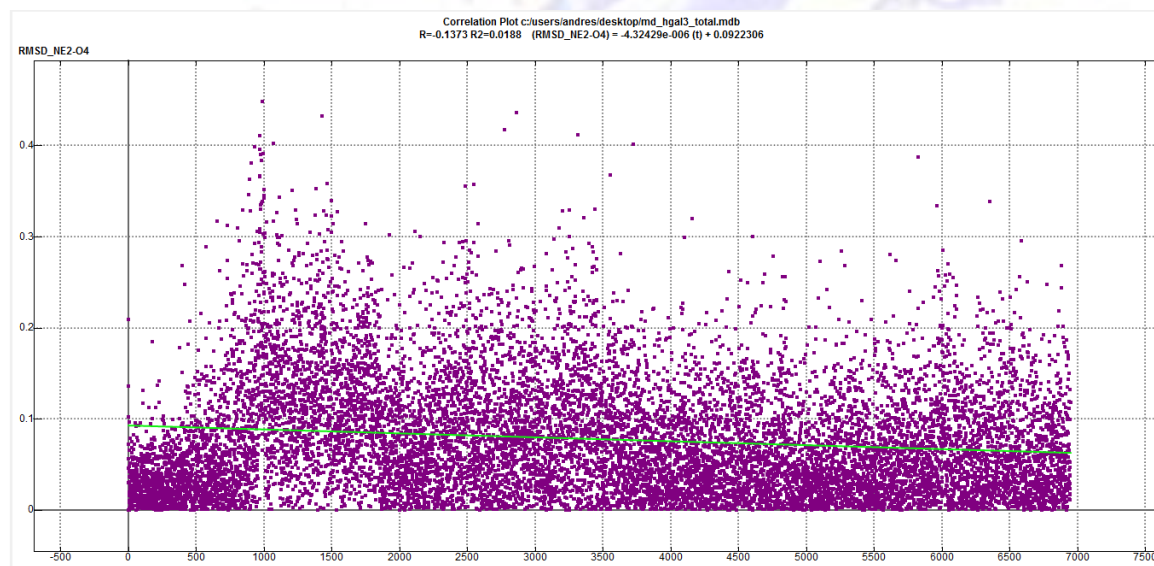
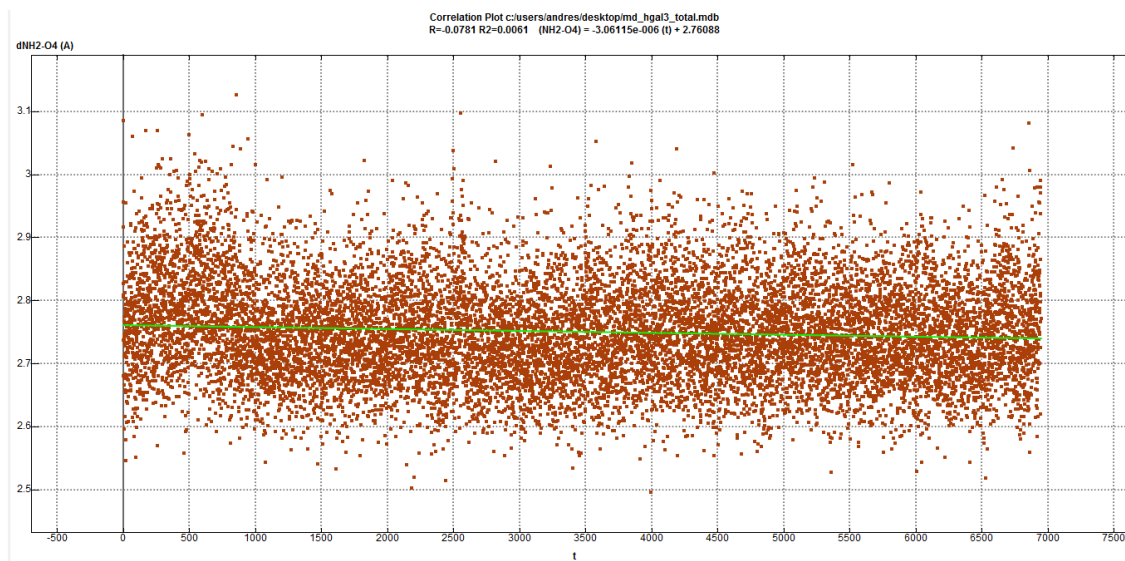


Figura A.4.4.2. RMSD His158 Nε – GalO4

Arg162 NH2 – GalO4



Figura

Figura A.4.4.3. Distancia Arg162 NH2 – GalO4

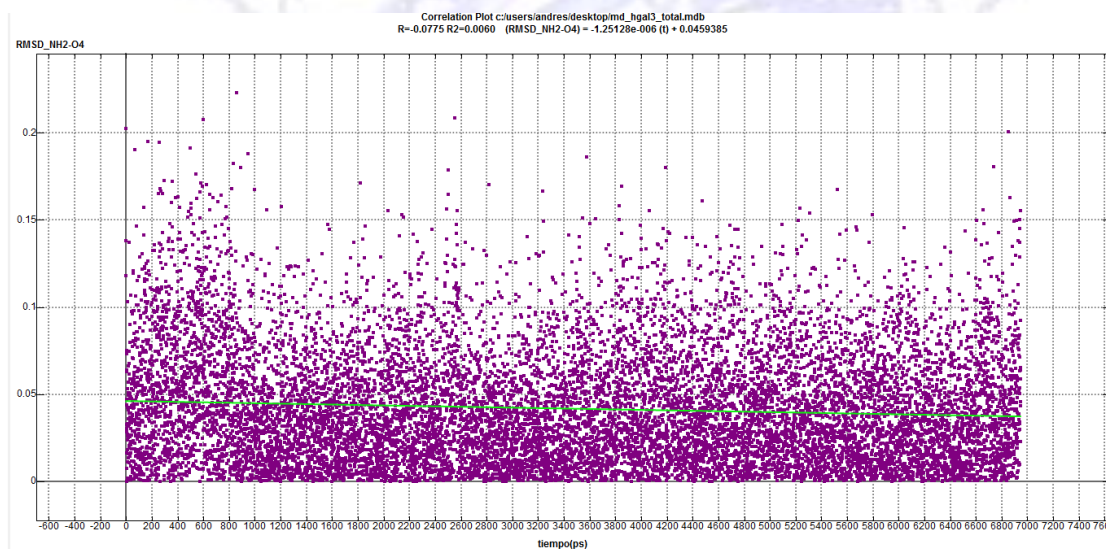
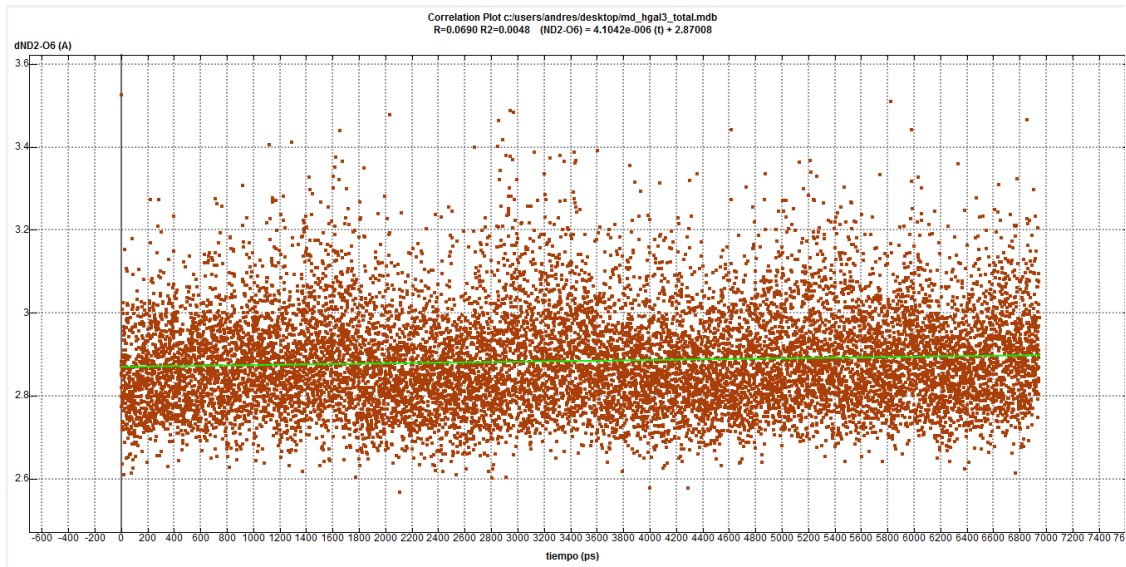


Figura A.4.4.4. RMSD Arg162 NH2 – GalO4

Asn174 N $\delta_2$  – GalO6



Figura

A.4.4.5. Distancia Asn174 N $\delta_2$  – GalO6

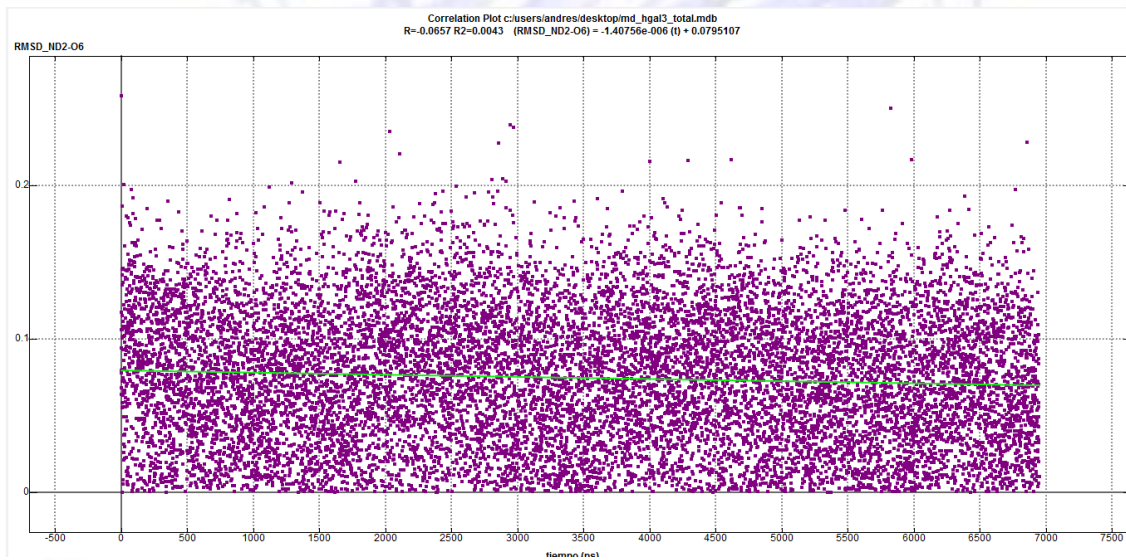
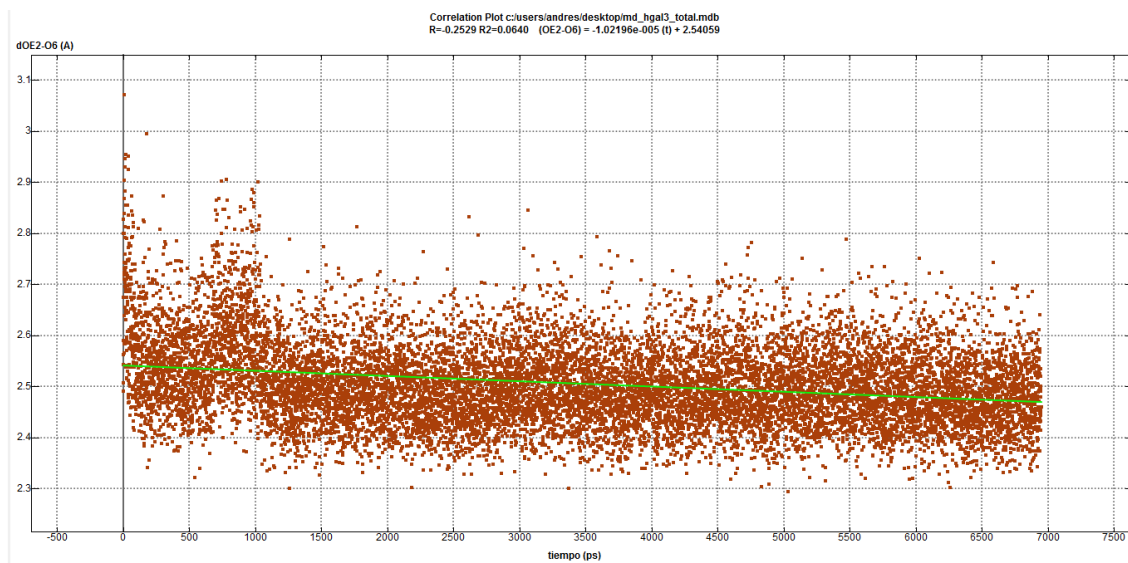
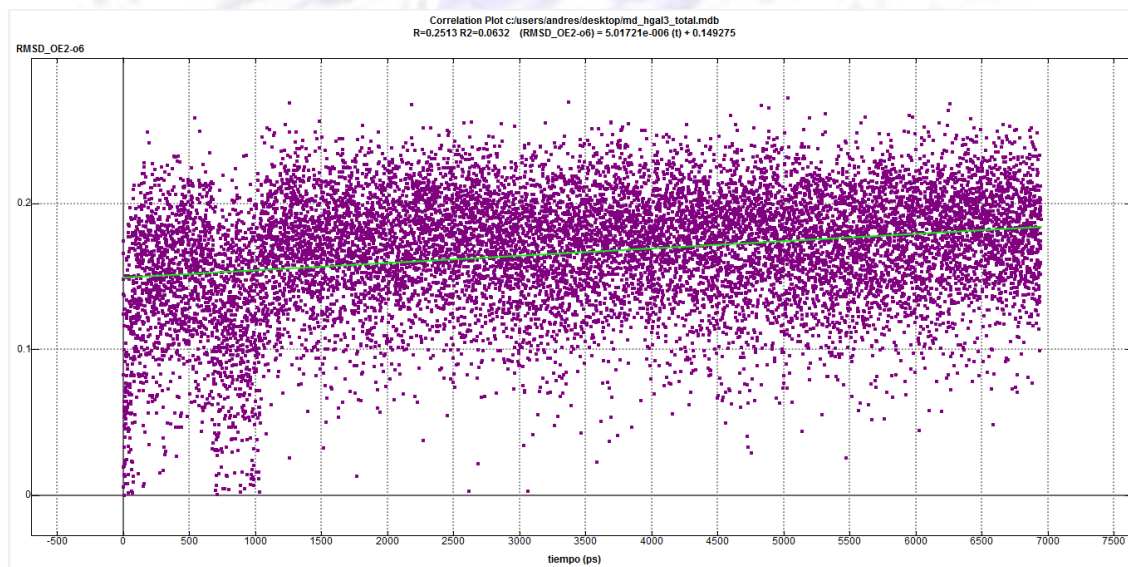


Figura A.4.4.6. RMSD Asn174 N $\delta_2$  – GalO6

**Glu184 O $\epsilon_2$  – GalO6**



**Figura A.4.4.7.** Distancia Glu184 O $\epsilon_2$  – GalO6



**Figura A.4.4.8.** RMSD Glu184 O $\epsilon_2$  – GalO6

Trp181 Nε<sub>2</sub> – GalO3

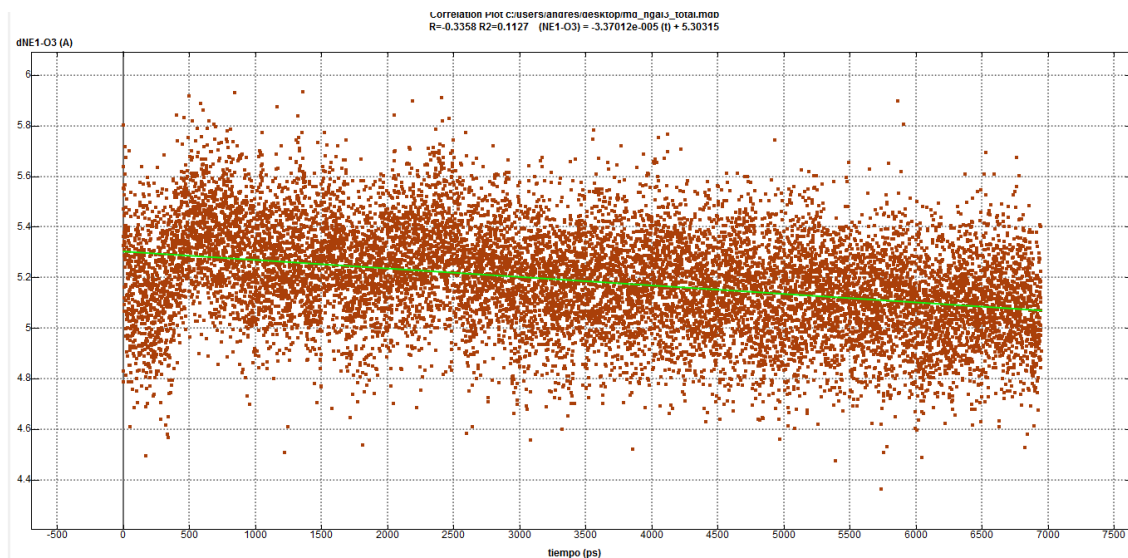


Figura A.4.4.9. Distancia Trp181 Nε<sub>2</sub> – GalO3

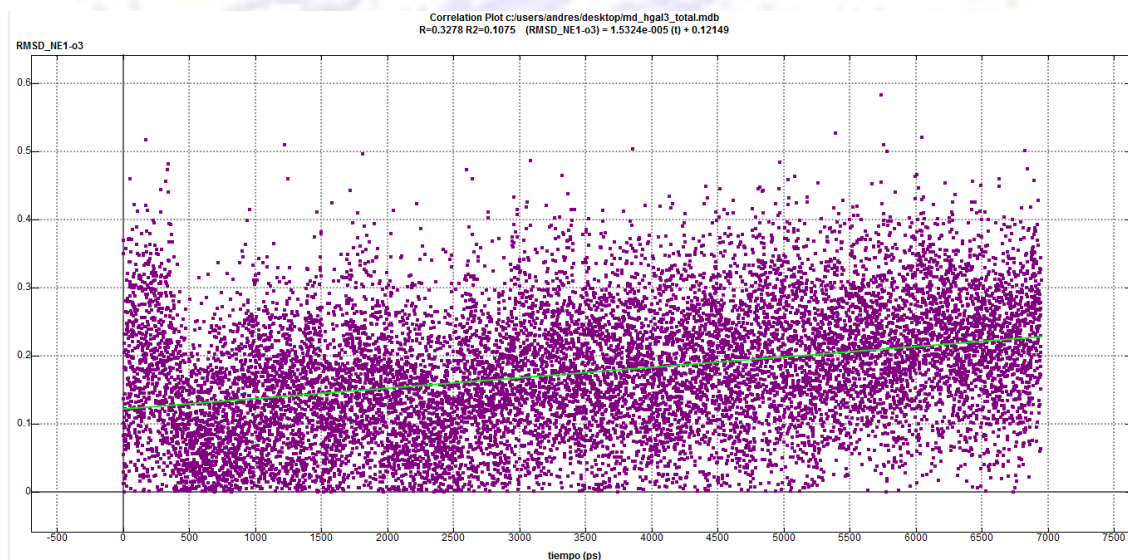


Figura A.4.4.10. RMSD Trp181 Nε<sub>2</sub> – GalO3

### Ángulo diedro H1-C1-O4-C4 ( $\phi$ )

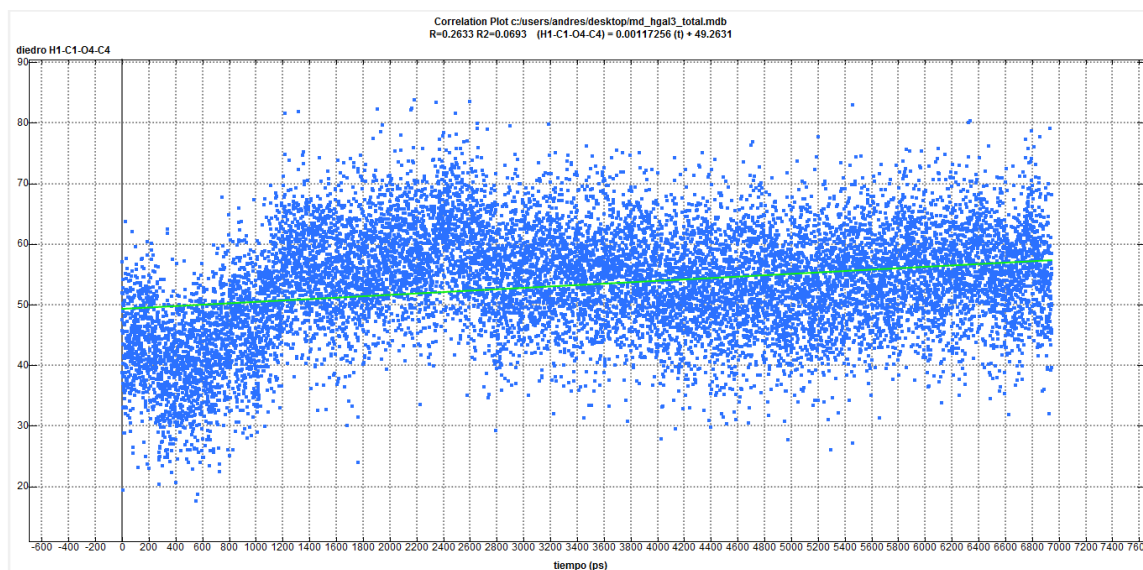


Figura A.4.4.11. Ángulo diedro H1-C1-O4-C4 ( $\phi$ )

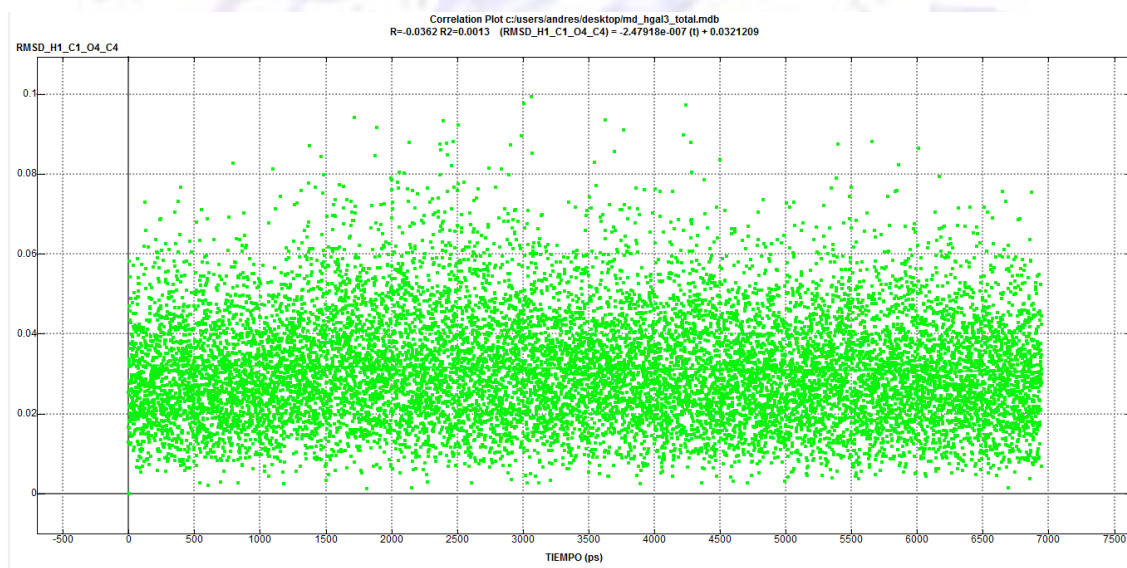


Figura A.4.4.12. RMSD Ángulo diedro H1-C1-O4-C4

### Ángulo diedro C1-O4-C4-H4

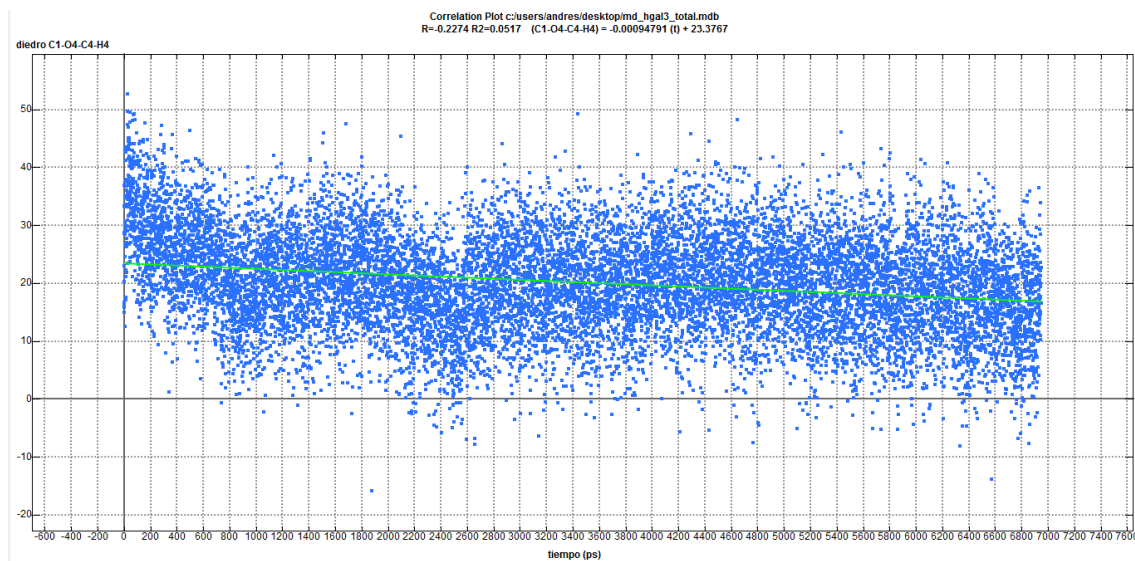


Figura A.4.4.13. Ángulo diedro C1-O4-C4-H4 ( $\psi$ )

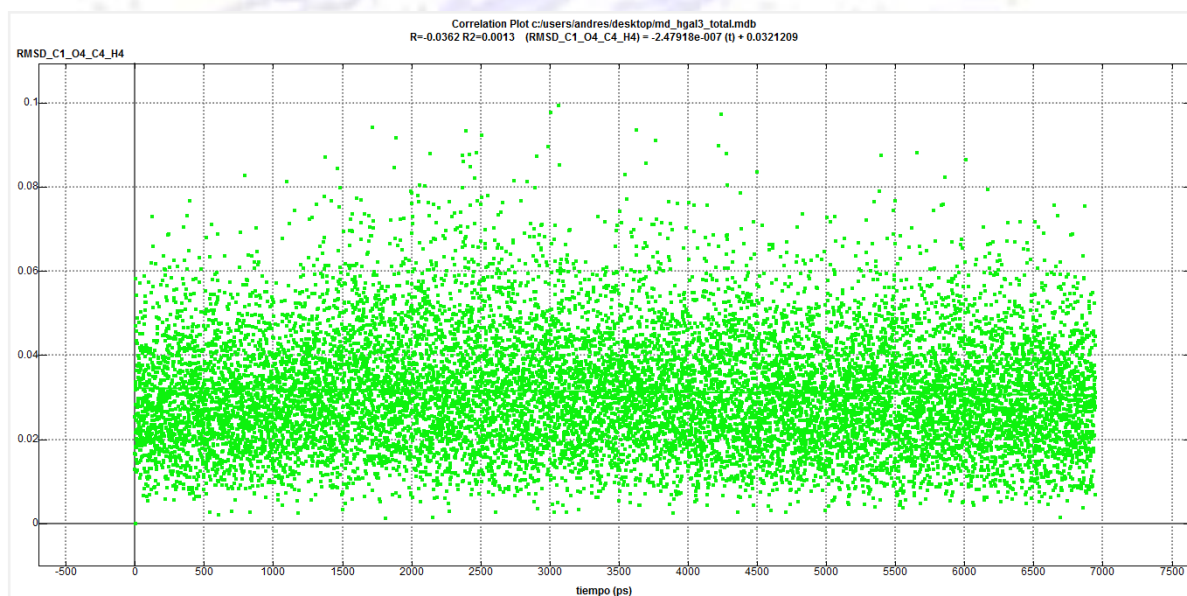


Figura A.4.4.14. RMSD Ángulo diedro C1-O4-C4-H4



Figura A.4.5. Poses seleccionadas experimentos Docking Molecular AUTODOCK4.2

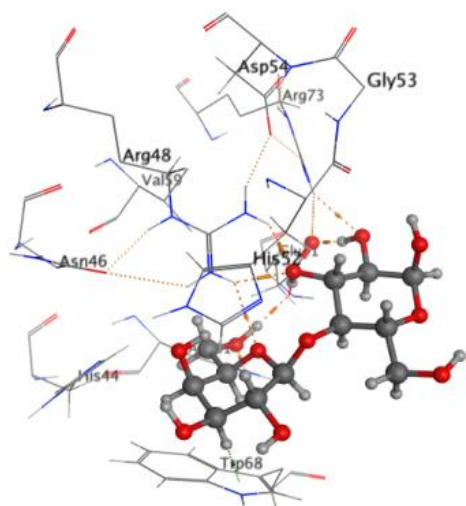


Figura A.4.5.1.1. Galectina-1 humana vs. Ligando 1

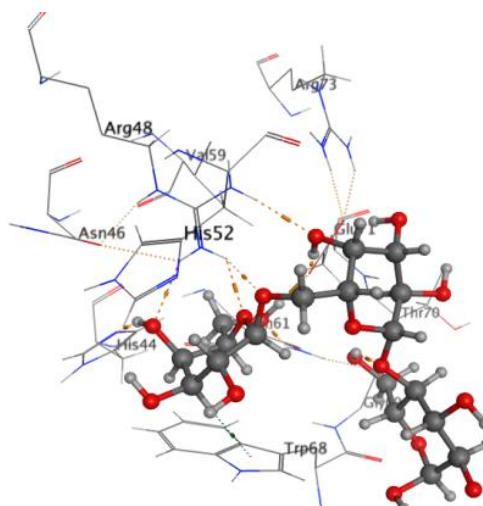


Figura A.4.5.1.2. Galectina-1 humana vs. Ligando 2

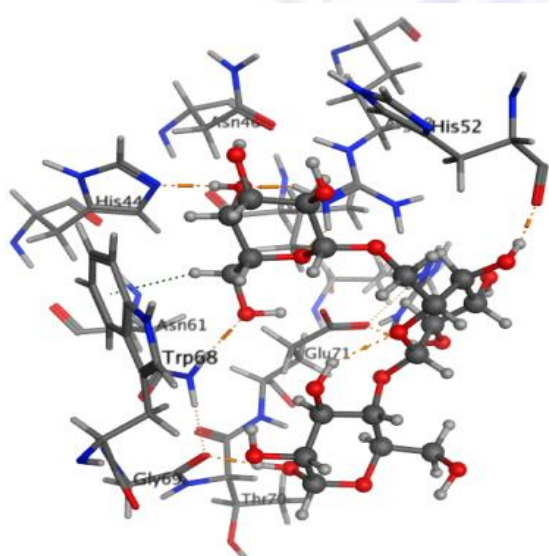


Figura A.4.5.1.3. Galectina-1 humana vs. Ligando 3

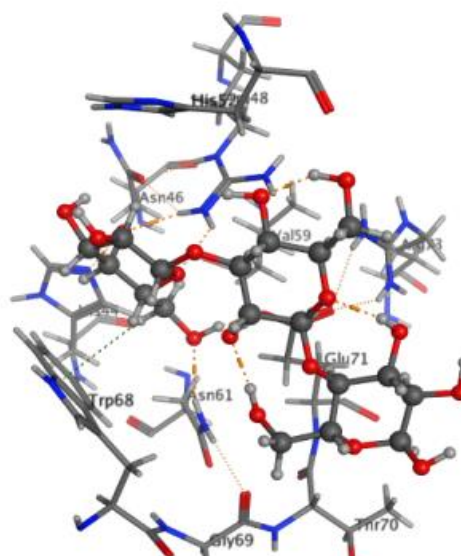


Figura A.4.5.1.4. Galectina-1 humana vs. Ligando 4

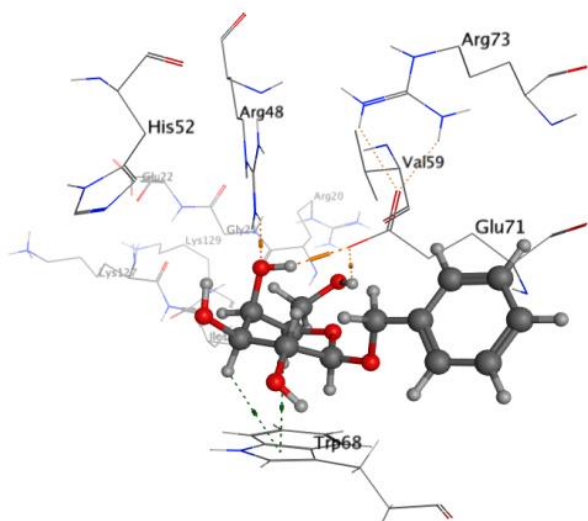


Figura A.4.5.1.5. Galectina-1 humana vs. Ligando 5

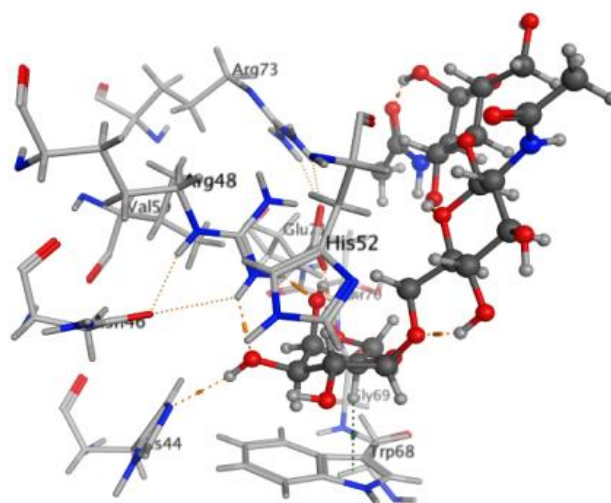


Figura A.4.5.1.6. Galectina-1 humana vs. Ligando 6

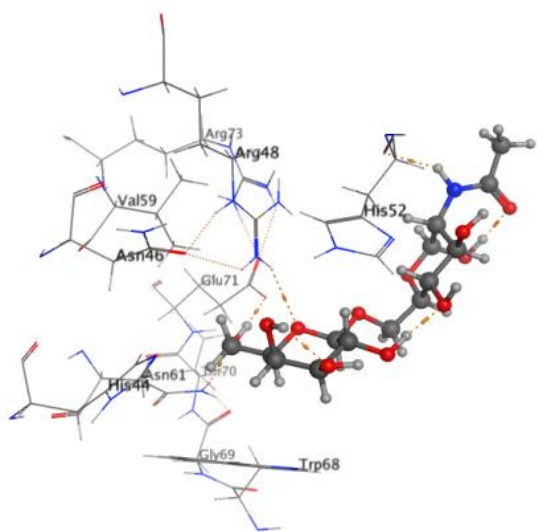


Figura A.4.5.1.7. Galectina 1 humana vs. Ligando 7

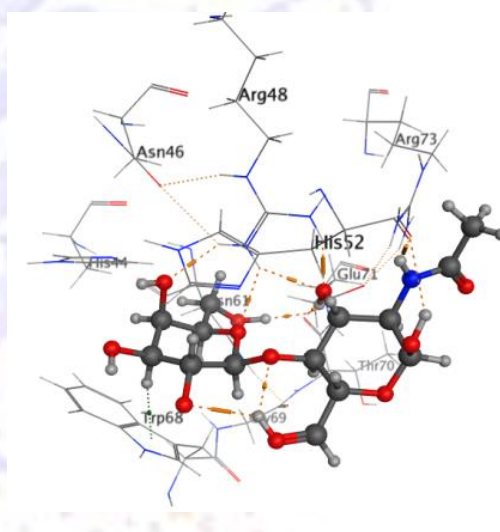


Figura A.4.5.1.8. Galectina 1 humana vs. Ligando 8

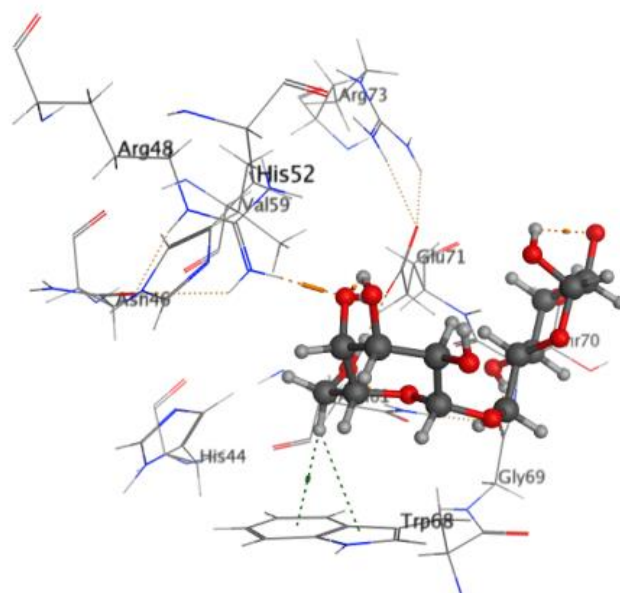
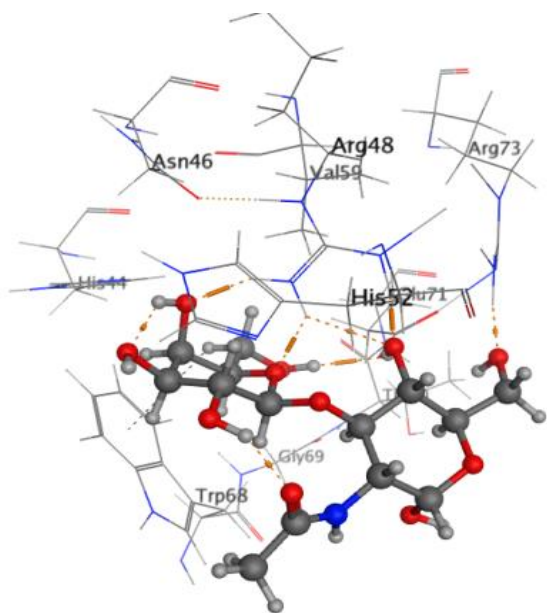


Figura A.4.5.1.9. Galectina 1 humana vs. Ligando 9

Figura A.4.5.1.10. Galectina 1 humana vs. Ligando 10



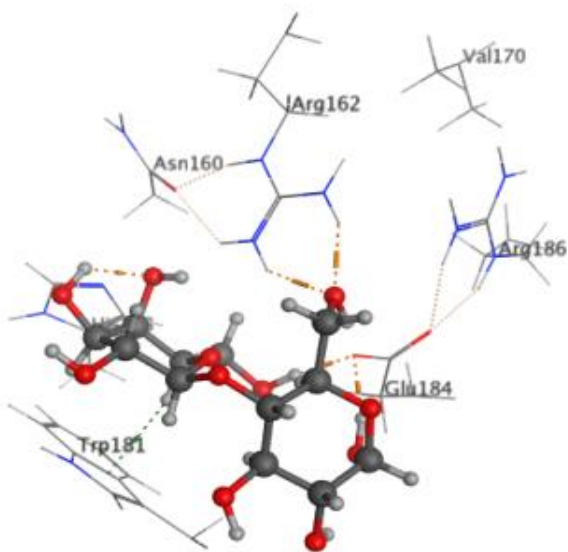


Figura A.4.5.2.1. Galectina 3 humana vs. Ligando 1

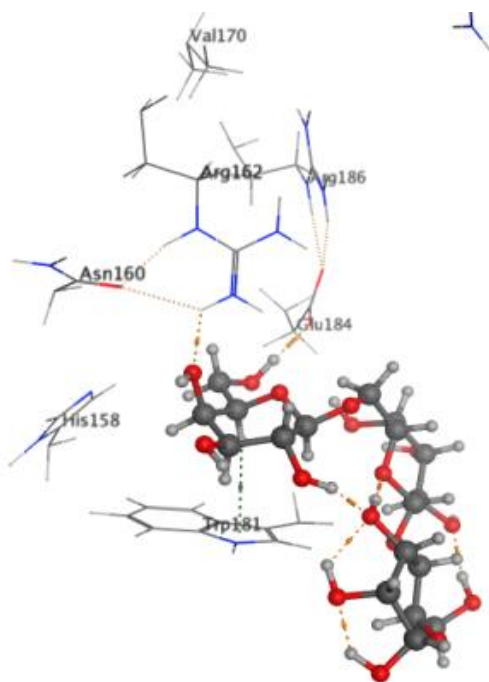


Figura A.4.5.2.2. Galectina 3 humana vs. Ligando 2

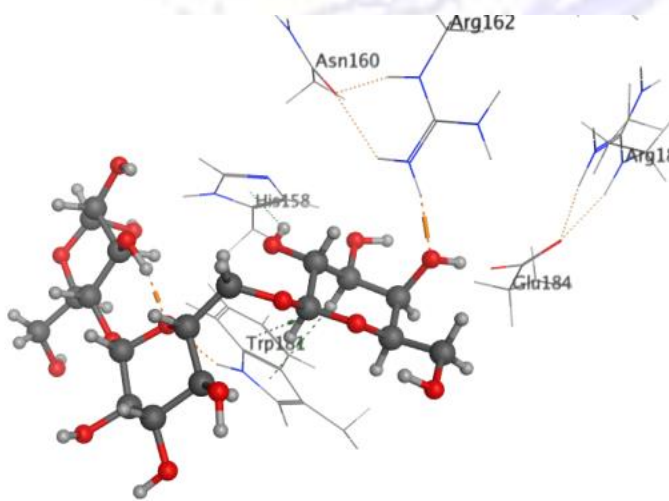


Figura A.4.5.2.3. Galectina 3 humana vs. Ligando 3

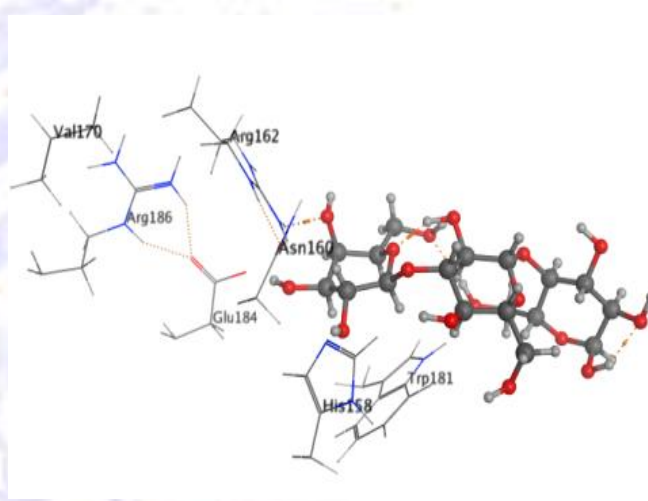


Figura A.4.5.2.4. Galectina 3 humana vs. Ligando 4

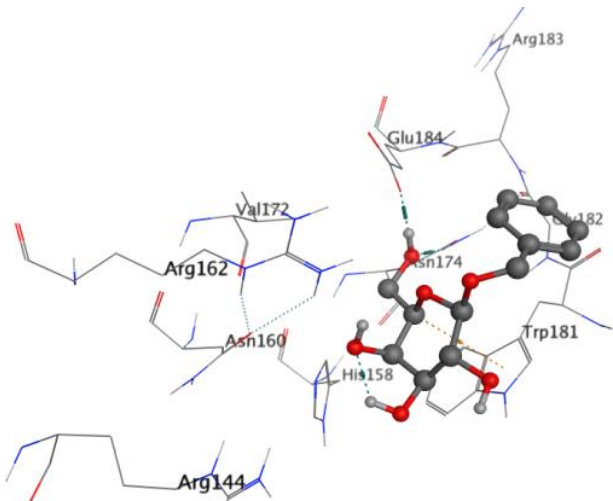


Figura A.4.5.2.5. Galectina 3 humana vs. Ligando 5

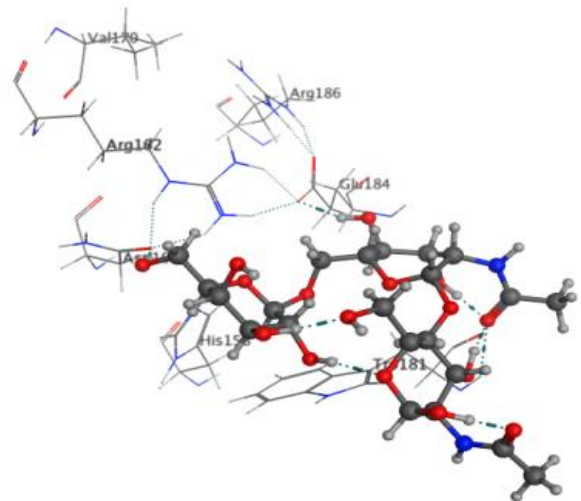


Figura A.4.5.2.6. Galectina 3 humana vs. Ligando 6

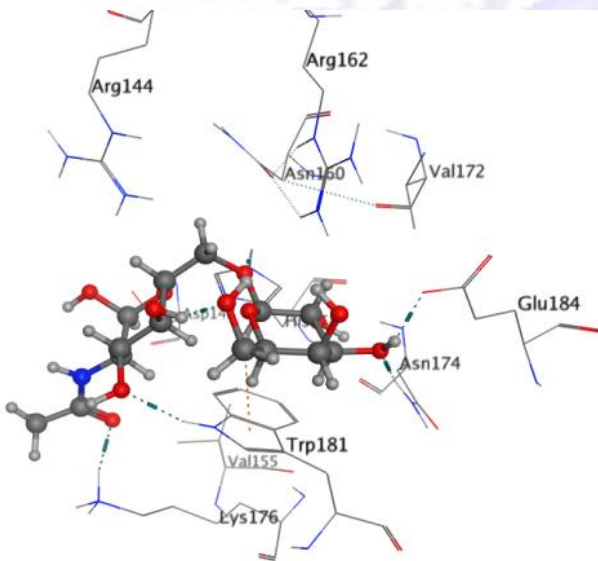


Figura A.4.5.2.7. Galectina 3 humana vs. Ligando 7

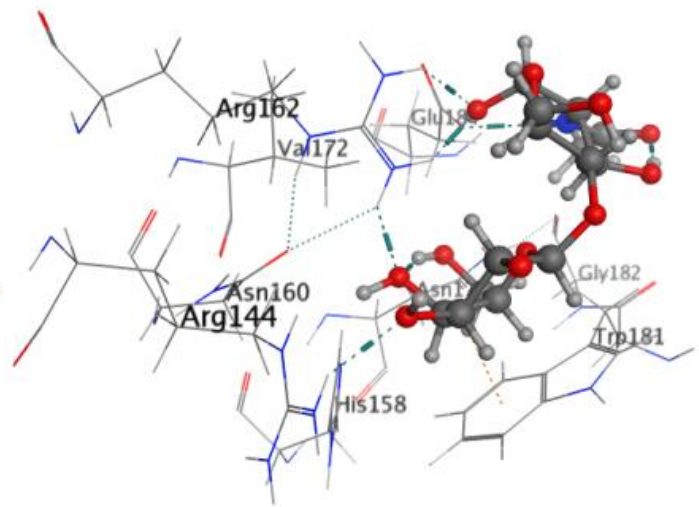


Figura A.4.5.2.8. Galectina 3 humana vs. Ligando 8

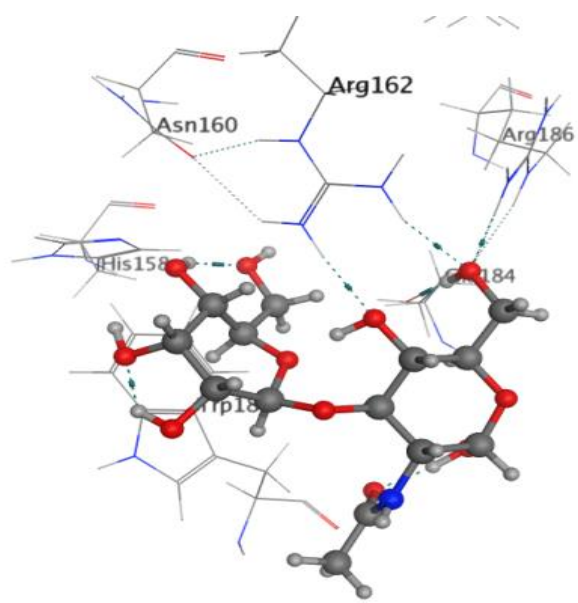


Figura A.4.5.2.9. Galectina 3 humana vs. Ligando 9

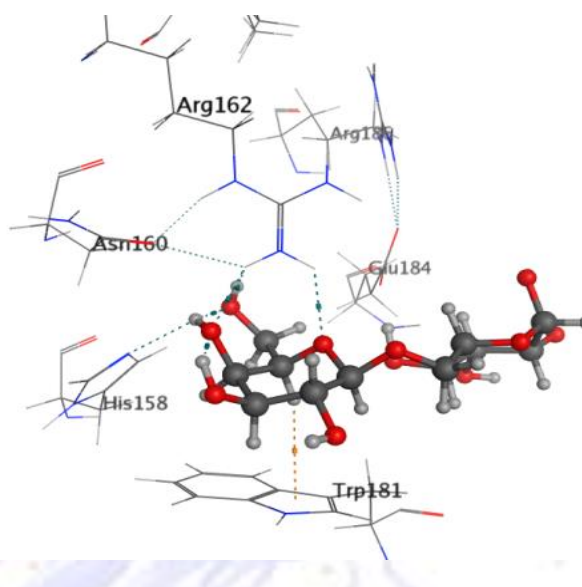


Figura A.4.5.2.10. Galectina 3 humana vs. Ligando 10

Figura A.4.6. Poses seleccionadas experimentos Docking Molecular Schrödinger

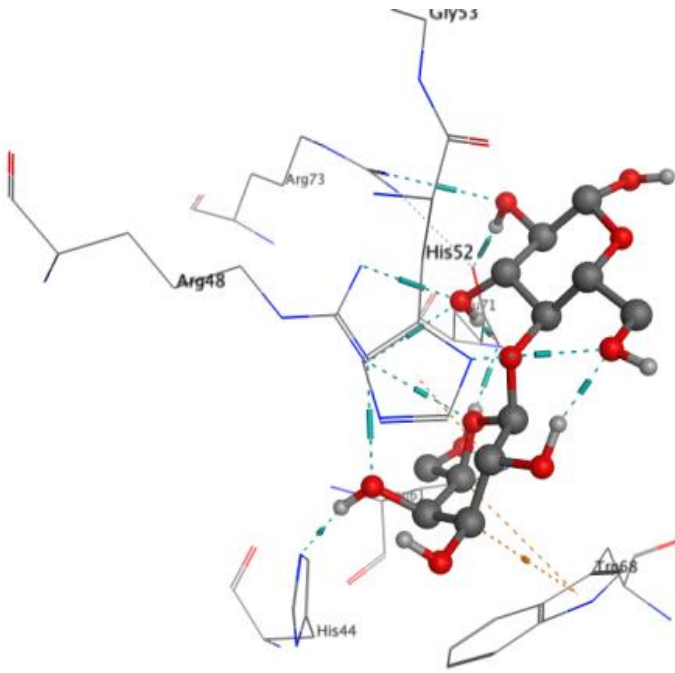


Figura A.4.6.1.1. Galectina 1 vs ligando 1

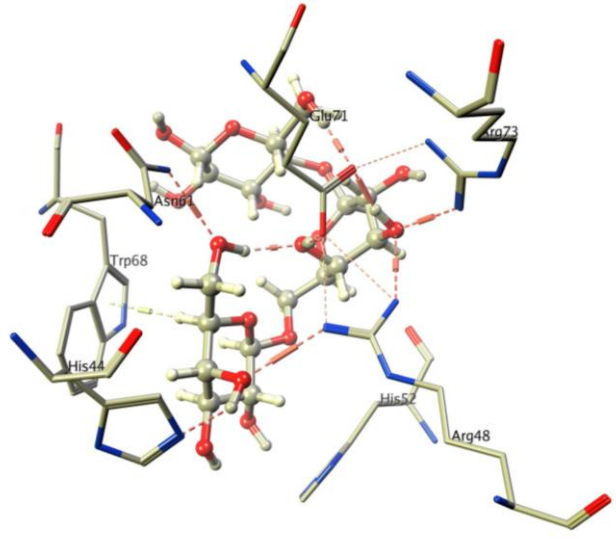


Figura A.4.6.1.2. Galectina 1 vs ligando 2

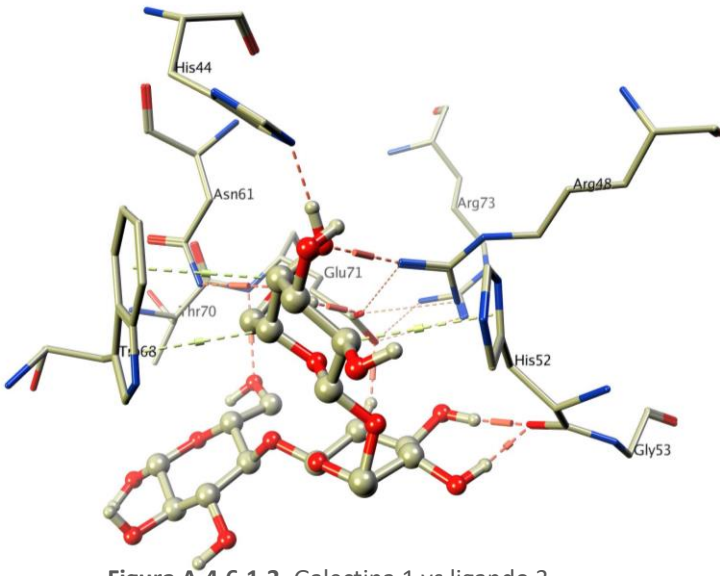


Figura A.4.6.1.3. Galectina 1 vs ligando 3

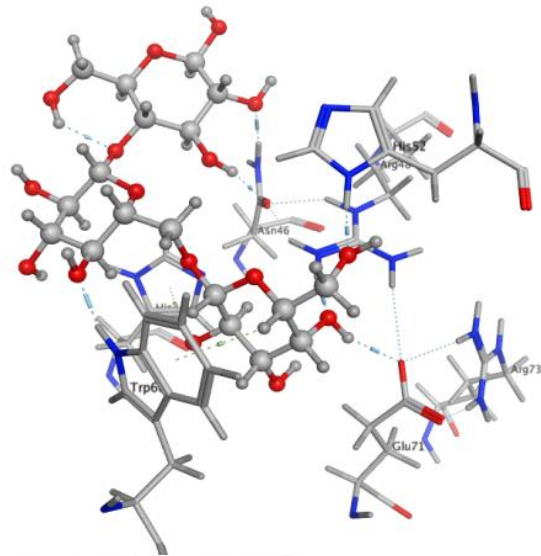


Figura A.4.6.1.4. Galectina 1 vs ligando 4

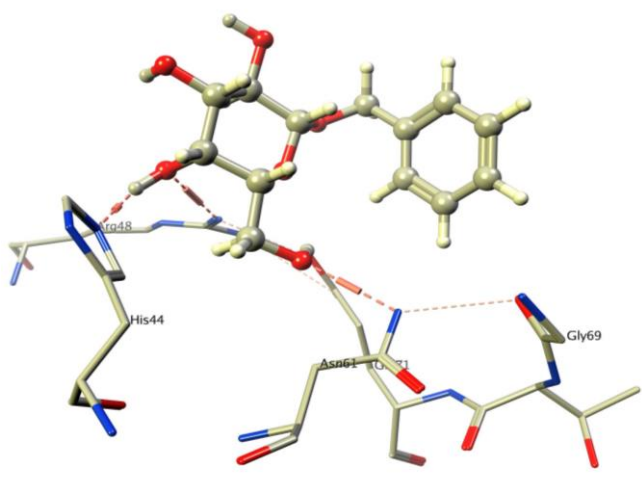


Figura A.4.6.1.5. Galectina 1 vs ligando 5

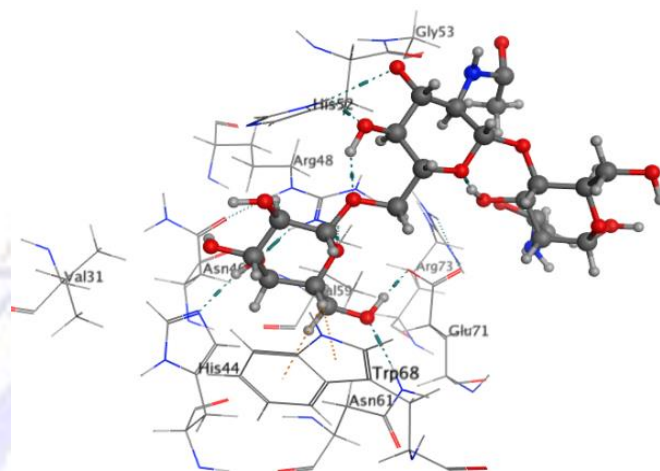


Figura A.4.6.1.6. Galectina 1 vs ligando 6

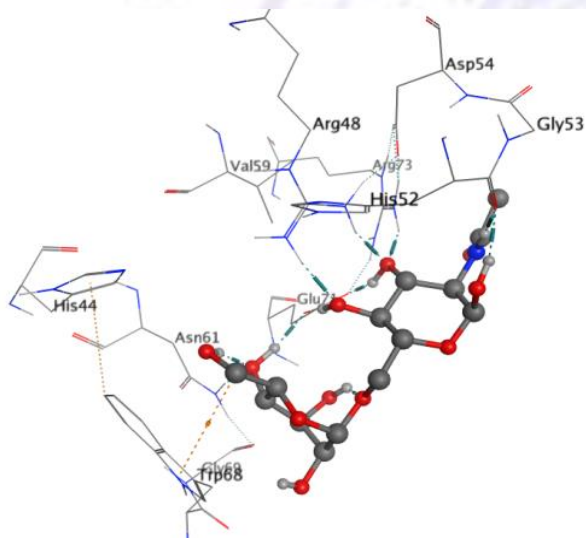


Figura A.4.6.1.7. Galectina vs Ligando 7

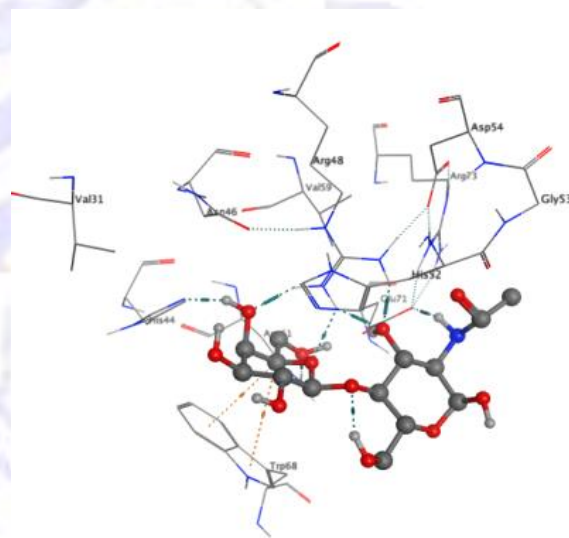


Figura A.4.6.1.8. Galectina vs Ligando 8



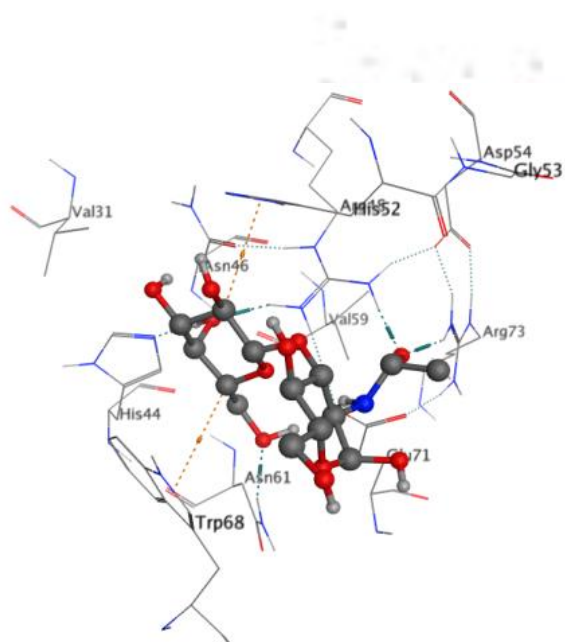


Figura A.4.6.1.9. Galectina vs Ligando 9

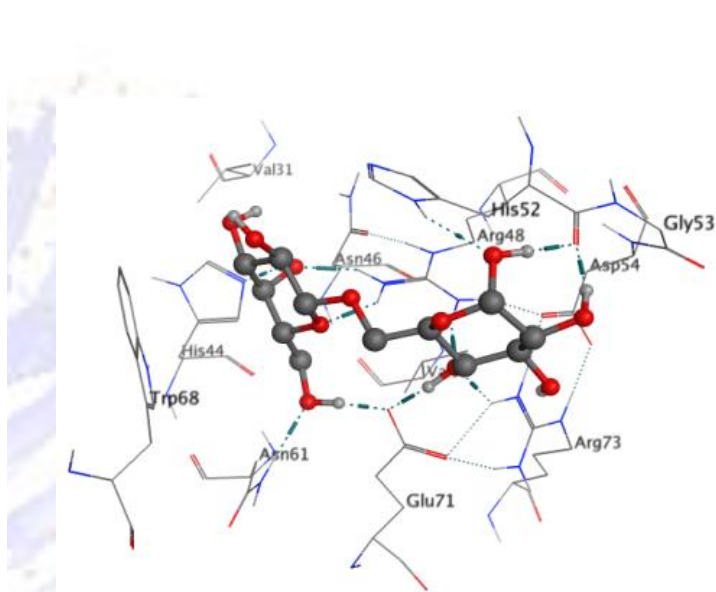


Figura A.4.6.1.10. Galectina vs Ligando 10

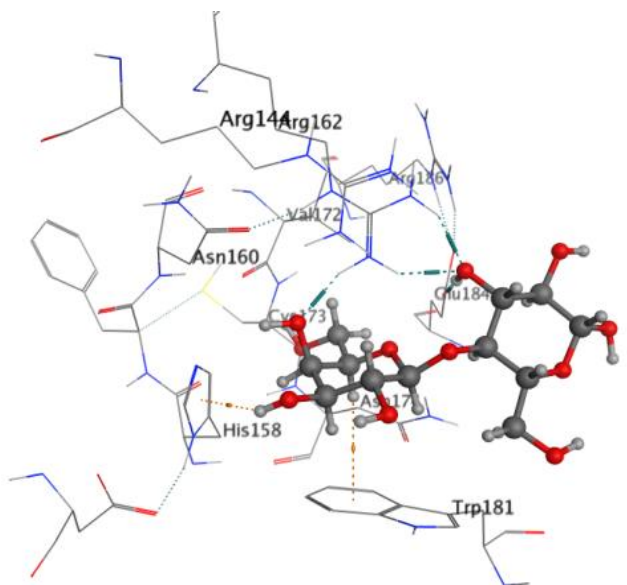


Figura A.4.6.2.1. Galectina 3 vs ligando 1

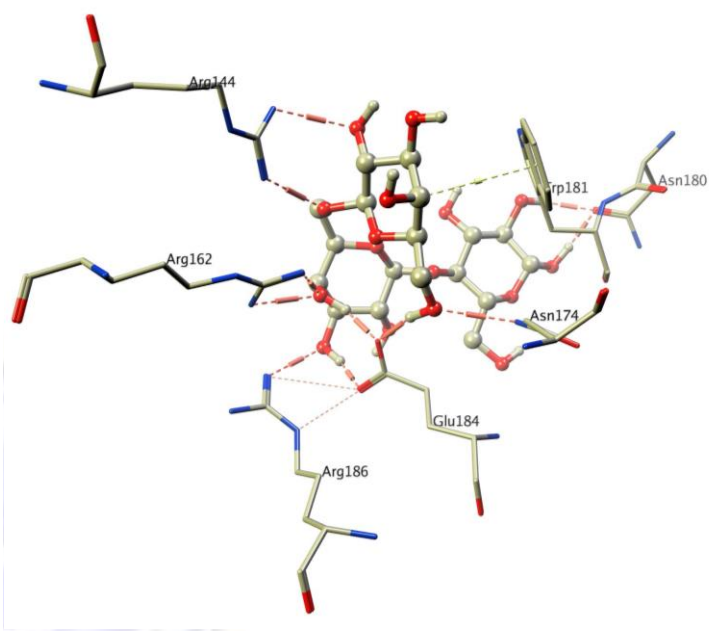


Figura A.4.6.2.2. Galectina 3 vs ligando 2

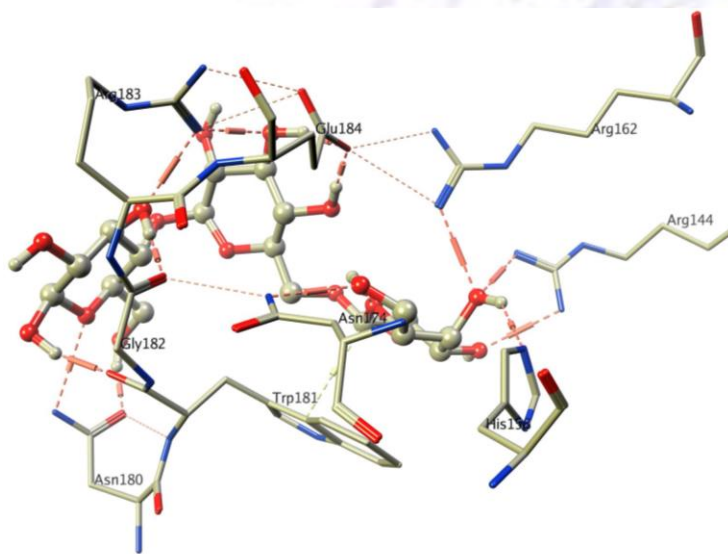


Figura A.4.6.2.3. Galectina 3 vs ligando 3

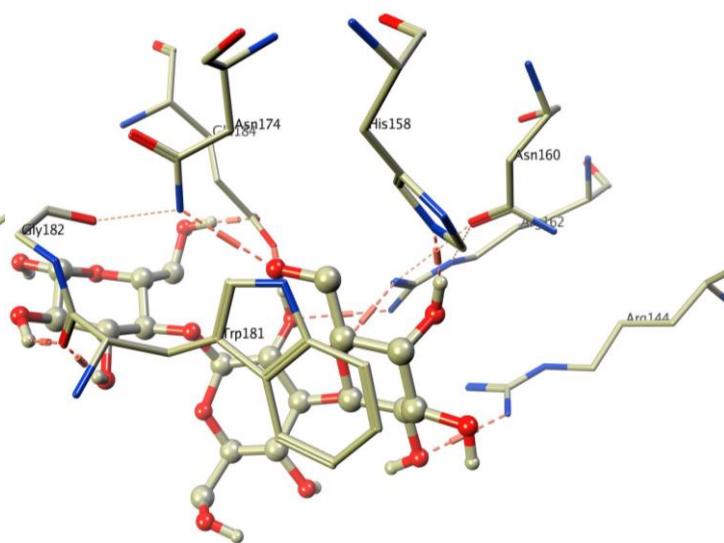


Figura A.4.6.2.4. Galectina 3 vs ligando 4

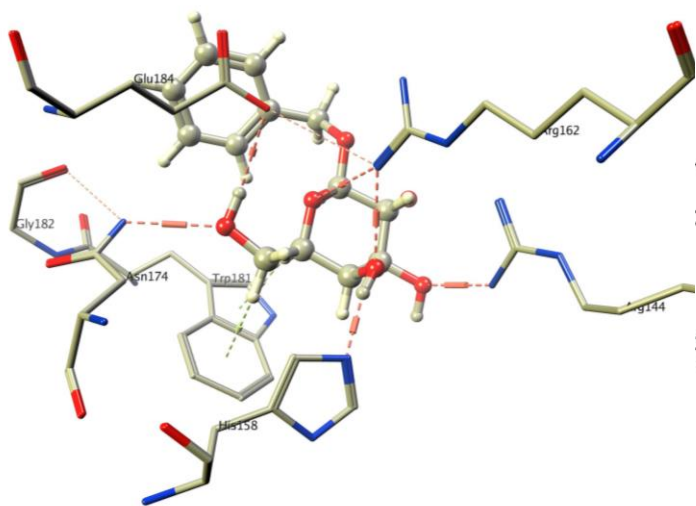


Figura A.4.6.2.5. Galectina 3 vs ligando 5

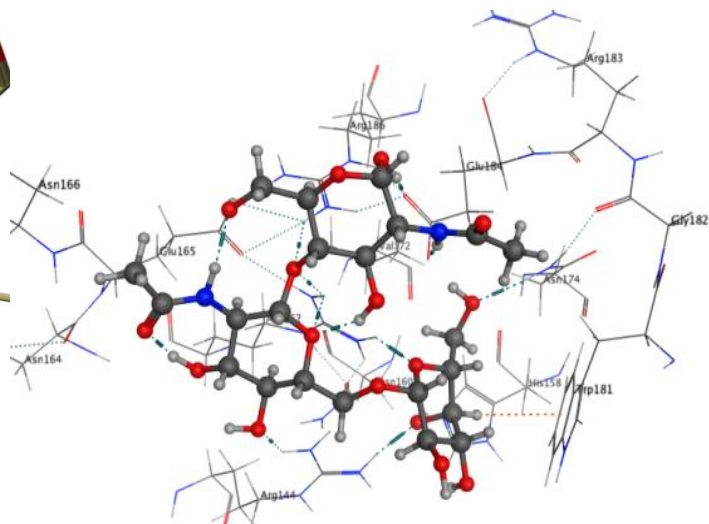


Figura A.4.6.2.6. Galectina 3 vs ligando 6

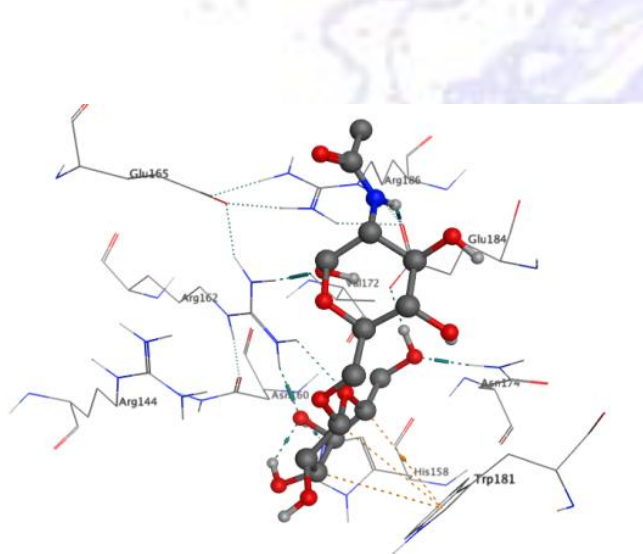


Figura A.4.6.2.7. Galectina 3 vs ligando 7

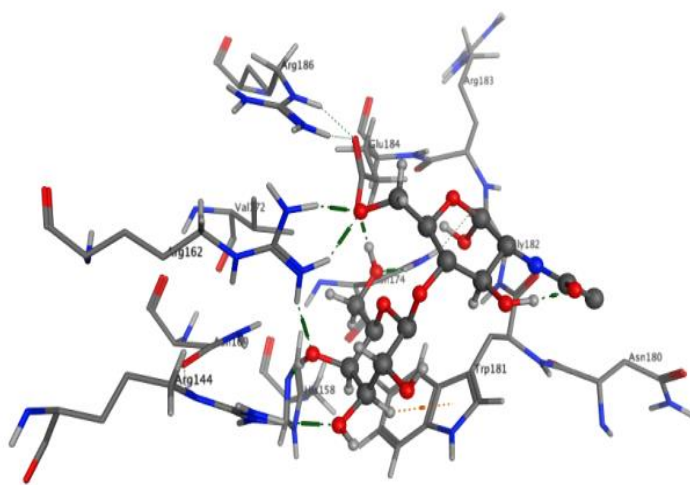


Figura A.4.6.2.8. Galectina 3 vs ligando 8

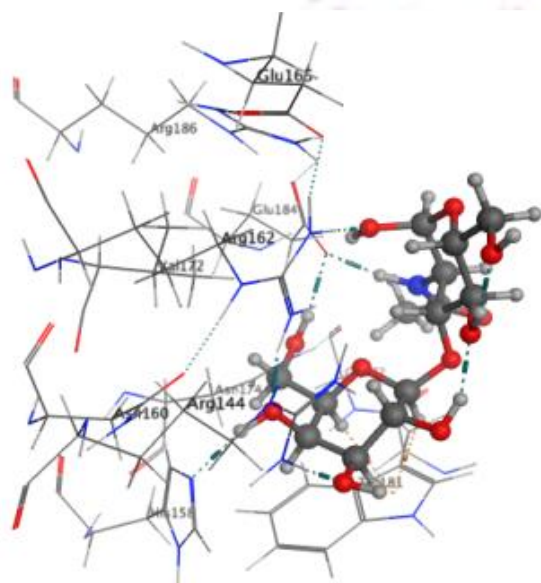


Figura A.4.6.2.9. Galectina 3 vs ligando 9

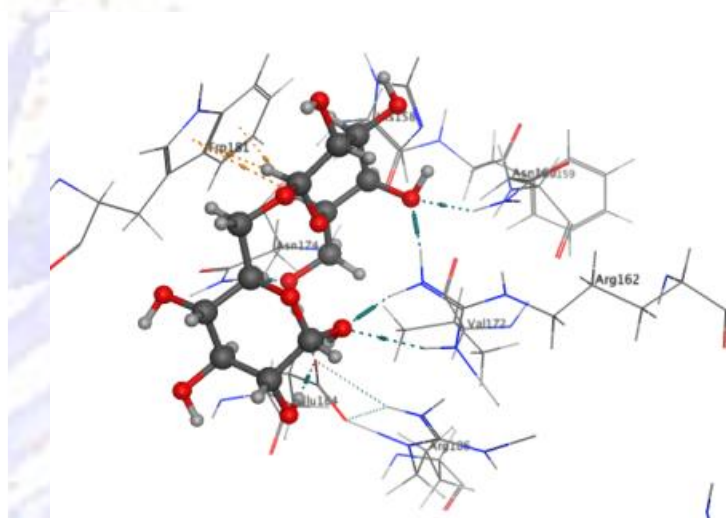


Figura A.4.6.2.10. Galectina 3 vs ligando 10



**PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTA  
TESIS**





## Enzymatic synthesis of non-natural trisaccharides and galactosides; Insights of their interaction with galectins as a function of their structure

Cecilia Porciúncula González<sup>a,d</sup>, Alejandro J. Cagnoni<sup>b</sup>, Karina V. Mariño<sup>b</sup>, Carolina Fontana<sup>c</sup>, Patricia Saenz-Méndez<sup>d</sup>, Gabriela Irazoqui<sup>a</sup>, Cecilia Giacomini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, UdelAR, Gral. Flores, 2124, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Laboratorio de Glicómica Funcional y Molecular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), C1428ADN, Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Laboratorio de Espectroscopía y Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, Facultad de Química & CENUR Litoral Norte, UdelAR. Ruta 3 km 363, 60000, Paysandú, Uruguay

<sup>d</sup> Computational Chemistry and Biology Group, DETEMA, Facultad de Química, UdelAR, Isidoro de María 1614, 11800, Montevideo, Uruguay

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Molecular modeling  
Galectins  
Oligosaccharides  
Galectin inhibitors  
Enzymatic synthesis  
 $\beta$ -galactosidase

### ABSTRACT

Galectins are a family of carbohydrate-recognizing proteins that by interacting with specific glycoepitopes can mediate important biological processes, including immune cell homeostasis and activation of tolerogenic circuits. Among the different members of this family, Galectin 1 and 3 have shown pro-tumorigenic effects, being overexpressed in numerous neoplastic diseases, proving to be relevant in tumor immune escape, tumor progression and resistance to drug-induced apoptosis. Thus, generation of specific glycosides that could inhibit their pro-tumorigenic ability by blocking their carbohydrate recognition domain is one of the current major challenges in the field. Considering that galectin-ligand binding strength is closely related to the ligand structure, analysis of this relationship provides valuable information for rational design of high-affinity ligands that could work as effective galectin inhibitors. Taking profit of the ability of glycosidases to catalyze transglycosylation reactions we achieved the enzymatic synthesis of  $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  4)-D-Glcp (**2**), a mixture of  $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  4)-D-Glcp (**5**) and  $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  4)-D-Glcp (**6**), and finally benzyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (**9**), with reaction yields between 16 and 27%. All the galactosides were purified, and characterized using <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. Docking results performed between the synthesized compounds and human Galectin 1 (hGal-1) and human Galectin 3 (hGal-3) showed that the replacement of a glucose moiety linked to the terminal galactose with a galactose moiety, decreases the affinity for these galectins. Moreover, regarding the interglycosidic bond the most favorable  $\beta$ -Gal linkage seems to be  $\beta$ (1  $\rightarrow$  4) followed by  $\beta$ (1  $\rightarrow$  3) and  $\beta$ (1  $\rightarrow$  6) for hGal-1, and  $\beta$ (1  $\rightarrow$  4) followed by  $\beta$ (1  $\rightarrow$  6) and  $\beta$ (1  $\rightarrow$  3) for hGal-3. These results were in accordance with the IC50 values obtained with in vitro solid phase inhibition assays. Therefore, docking results obtained in this work proved to be a very good approximation for predicting binding affinity of novel galactosides.

### 1. Introduction

In the last few years, technological advances provided a new functional insight into the cellular glycome, the profile of glycans displayed on the cell surface. Depending on the particular structures, and via specific interactions with different glycan-binding proteins (lectins), carbohydrates can trigger a variety of biological processes including immune cell homeostasis, vascular signaling programs and activation of tolerogenic circuits that mediate tumor-immune escape mechanisms

[1–5]. Among the various lectin families, galectins are probably the most conserved and ubiquitous, with members identified in most animal taxa examined so far [1,6]. They share a conserved sequence in the carbohydrate recognition domain (CRD) showing affinity for  $\beta$ -galactosides, usually in the form of *N*-acetylglucosamine (LacNAc) [2,7]. Experimental and theoretical studies indicate that galactose, being a monosaccharide, is a poor ligand for galectins and that different members of this family show dissimilar binding preferences for  $\beta$ -galactosides derivatives including branched, repeated as well as

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [dcpq@fq.edu.uy](mailto:dcpq@fq.edu.uy) (C. Porciúncula González), [alejandrojccagnoni@gmail.com](mailto:alejandrojccagnoni@gmail.com) (A.J. Cagnoni), [kvmarinosp@gmail.com](mailto:kvmarinosp@gmail.com) (K.V. Mariño), [cfontan@fq.edu.uy](mailto:cfontan@fq.edu.uy) (C. Fontana), [psaenz@fq.edu.uy](mailto:psaenz@fq.edu.uy) (P. Saenz-Méndez), [mgidrv@fq.edu.uy](mailto:mgidrv@fq.edu.uy) (G. Irazoqui), [cgiacomini@fq.edu.uy](mailto:cgiacomini@fq.edu.uy) (C. Giacomini).

<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.10.011>

Received 27 August 2018; Received in revised form 26 October 2018; Accepted 28 October 2018

Available online 03 November 2018

0008-6215/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

substituted oligosaccharides [7–11]. From all members of this lectin family, Galectin 1 (Gal-1) and Galectin 3 (Gal-3) are the most thoroughly studied due to their relevance in immune regulation and tumor progression, even presenting pro-angiogenic activities [2,12]. Gal-1 is a protein containing 134 amino acids and can be structurally classified as a prototype galectin. It presents one CRD, that can be found in a monomeric form or forming homodimers through non-covalent interactions. On the other hand, Gal-3 is the only chimera type member of the galectin family, and presents a short NH<sub>2</sub>-terminal domain containing a serine phosphorylation site composed of tandem repeats of proline- and glycine-rich short stretches fused onto the CRD [1,6,13,14]. The CRD of both galectins is composed by five subsites (A–E), able to hold a linear tetrasaccharide [8,13]. The subsite C, highly conserved in all galectin members, is the binding site for the β-galactose residue, while subsite D interacts with the monosaccharide to which the β-galactose is bound through its anomeric carbon. There are a series of specific hydrogen bonds between carbohydrate's polar groups and the amino acids side chains from the protein backbone (subsite C and D). The main interactions involve hydrogen bonds between galactose O4 and His44 and Arg48 for hGal-1 [8,15,16], and His158, Arg162 and Asn160 for hGal-3 [17,18]. Additionally, the hydrophobic interaction between the galactose ring and a Trp residue within subsite C is essential (Trp 68 in hGal-1 and Trp181 in hGal-3). On the other hand, subsites A–B and D–E present differences between the diverse galectins types, allowing different specificity for a subset of β-galactosides [8,19,20]. Particularly for hGal-3, the interaction between galactose O6 as well as O3 in the adjacent monosaccharide moiety, with the amino acidic residues in the galectin CRD also plays a central role in the stability of the galectin-ligand complex [17,18]. According to Meynier et al., 2009 [8], theoretical studies indicates that the galactose monosaccharide alone is a poor ligand for hGal-1, being necessary the presence of a second monosaccharide moiety to provide a higher-affinity ligand. Moreover, their results suggest that the nature of the carbohydrate bound to the anomeric carbon of the terminal galactose, would be relevant for galectin-ligand complex affinity. In this sense, the presence of a glucopyranose ring rather than a galactopyranose one would stabilize the galectin-ligand complex [8]. Besides those aspects, interglycosidic linkage should also be considered, as differences in the type of glycosidic bond leads to different orientation of the sugar linked to the terminal galactose changing the network of hydrogen bonds, which in turn can modify the stability of the galectin-ligand complex. Both *N*-acetyllactosamine (β-D-Galp-(1 → 4)-D-GlcpNAc) and lacto-*N*-biose (β-D-Galp(1 → 3)-D-GlcpNAc) can interact with hGal-1 [8] and have been characterized as natural galectin ligands with different affinities depending on the family member [21,22]. In fact, both hGal-1 and hGal-3 show higher affinity for *N*-acetyllactosamine than for lacto-*N*-biose [22]. Other linkages such as β-(1 → 6) have not yet been studied.

Thus, understanding the structural features of galectin-glycan interactions has become a valuable strategy in the development of therapeutic approaches. In fact, inhibition of hGal-1 and hGal-3 by blocking the CRD with glycosides that compete with their natural ligands could inhibit their pro-tumorigenic ability [12,23]. Therefore, the availability of pure oligosaccharides and glycosides with defined structure are essential in order to face this approach.

In this context, glycosidases are excellent alternatives as catalysts for synthetic purposes as their stereoselectivity allows the production of anomerically pure glycosides in only one reaction step using mild reaction conditions [24–27]. One of the most used glycosidases for the enzymatic synthesis of galactosides is *Aspergillus oryzae* β-galactosidase (E.C. 3.2.1.23), which catalyzes the transfer of a galactosyl moiety from a donor molecule to an acceptor, preserving the anomeric center configuration. Transgalactosylation reactions catalyzed by this enzyme have already been used for the synthesis of different products, mainly galacto-oligosaccharides (GOS) [28–32].

Taking into account the relevance of hGal-1 and hGal-3 in tumor development, the previous characterization of their CRD, and the

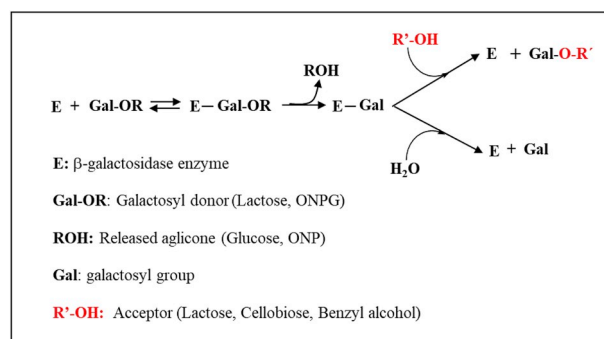
interactions with their natural ligands, we aimed to produce rationally designed galactosides, which could interact with high affinity and selectivity with hGal-1 and hGal-3. Therefore, in order to shed some light on the interactions involved in the carbohydrate recognition domain, we studied the binding of three different galactosides to hGal-1 and hGal-3. The galactosides prepared and characterized in this study were: i) β-D-Galp-(1 → 6)-β-D-Galp-(1 → 4)-D-Glcp (2), ii) a mixture of β-D-Galp-(1 → 6)-β-D-Glcp-(1 → 4)-D-Glcp (5) and β-D-Galp-(1 → 3)-β-D-Glcp-(1 → 4)-D-Glcp (6), and iii) benzyl β-D-galactopyranoside (9). All the galactosides were enzymatically synthesized, purified, and characterized using <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. Moreover, and in order to gain insights into the structural features of galectin-glycan complexes, we performed *in silico* molecular docking experiments. To this end, we first compared the CRD of both hGal-1 and hGal-3 and then performed an induced fit docking of the synthesized ligands. We analyzed the interactions between galectins and ligands and correlated the binding energies with the experimental IC<sub>50</sub> obtained by *in vitro* solid-phase assays.

## 2. Results

### 2.1. Synthesis

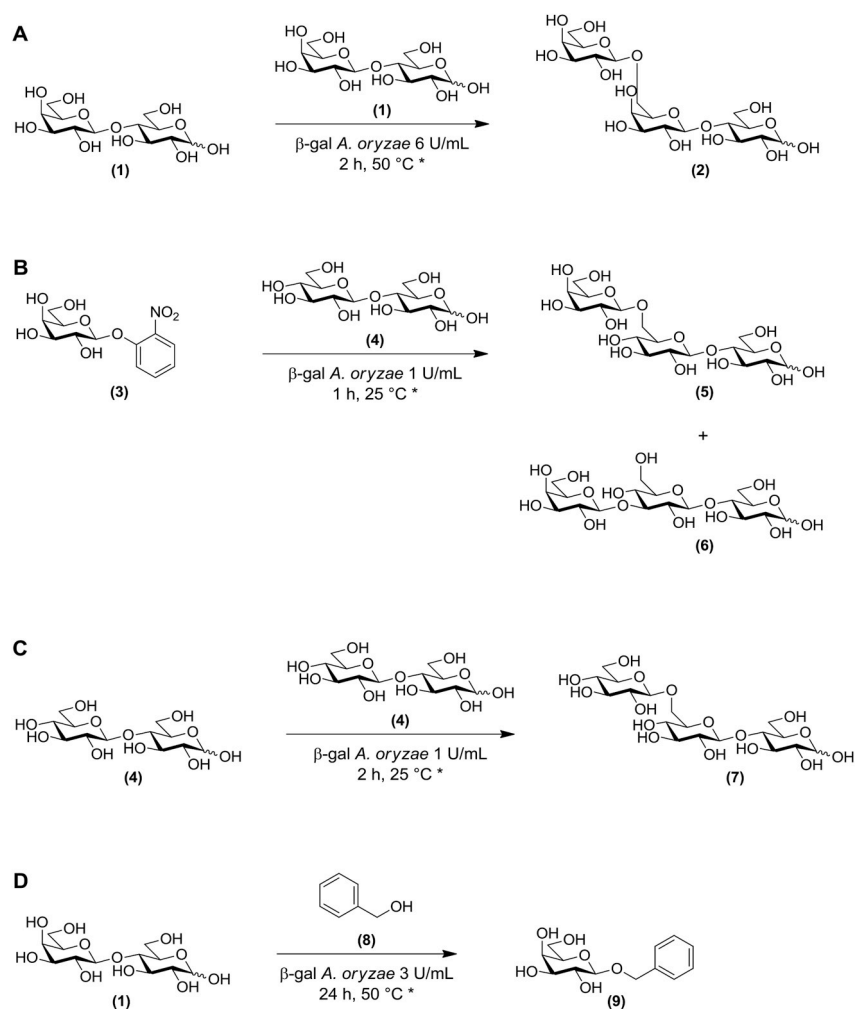
In view of the experimental evidence previously reported regarding the relevance of the structure of the monosaccharide moiety adjacent to the galactose recognized by subsite C in the binding affinity of galactosides towards galectins, we assayed the synthesis of trisaccharides containing either glucose or galactose in this position [7]. The enzymatic syntheses were achieved by taking advantage of the ability of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase to catalyze the transfer of a galactose moiety from a galactosyl donor to an hydroxylated acceptor [26]. The enzyme mechanism involves two steps (Scheme 1). In the first step, the enzyme interacts with the galactosyl donor forming an enzyme-galactose complex while the aglycone of the galactosyl donor is released. In a second step, either water present on the reaction mixture or the acceptor reacts with the enzyme-galactose complex releasing galactose or the corresponding galactosyl-acceptor respectively. As β-galactosidase is a retaining enzyme, the configuration of the anomeric center is retained and thus, only affords the corresponding β-galactosides [26].

The synthesis of the trisaccharide β-D-Galp-(1 → X)-β-D-Galp-(1 → 4)-D-Glcp was achieved by incubation of *A. oryzae* β-galactosidase (6 U/mL) and lactose (β-D-Galp-(1 → 4)-D-Glcp) (1) 100 mM at 50 °C for 2 h (Scheme 2A). The reaction mixture was analyzed by thin layer chromatography (TLC) (Fig. 1A). Spots corresponding to the unreacted lactose (R<sub>f</sub> 0.25), its hydrolysis products, glucose (R<sub>f</sub> 0.43) and galactose (R<sub>f</sub> 0.32), as well as a new product with R<sub>f</sub> 0.10, were observed. The latter could be attributed to the product of the transgalactosylation reaction (compound 2), in which the β-galactosidase catalyzed the transfer of a galactose moiety from one molecule of lactose (1) to another one. In this case, lactose fulfills the double function of galactosyl donor and acceptor (Scheme 1 and Scheme 2A). Compound 2 was



Scheme 1. Transgalactosylation system.





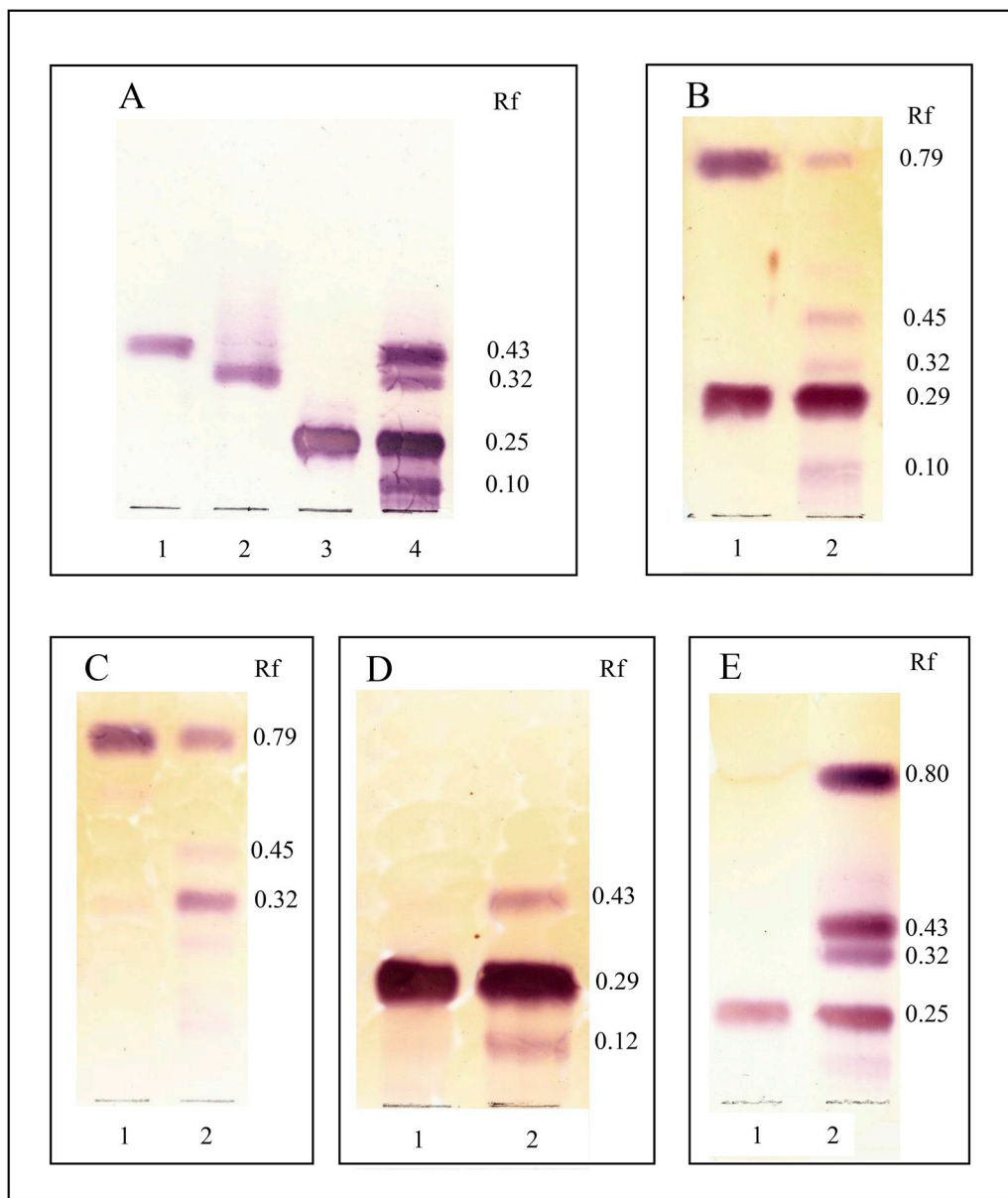
**Scheme 2.** Transglycosylation reactions catalyzed by *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase.

purified by size exclusion chromatography as described in the experimental section, and its purity checked by analytical TLC and HPLC (Fig. 2A and Figs. S1–A in supplementary material). The major component (> 80%) of the resulting material was characterized using NMR spectroscopy. The assignments of the  $^1\text{H}$  resonances within each monosaccharide spin system were carried out using  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY spectra recorded with different mixing times (20, 40, 60 and 100 ms) and a  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY spectrum recorded with a mixing time of 500 ms (Fig. S2-A and S2-B in supplementary material). The resonances of the residue located at the reducing end of the trisaccharide (A) were identified in both  $\alpha$ - and  $\beta$ -pyranose forms (residues  $A_\alpha$  and  $A_\beta$ , respectively). The correlation patterns in the  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY spectra confirmed that residue A has the *gluco*-configuration, whereas residues B and C have the *galacto*-configuration. Residues B and C are  $\beta$ -linked since  $^3J_{\text{H1,H2}}$  is 7.9 Hz in both cases. The  $^{13}\text{C}$  resonances of the sugar residues were assigned using a multiplicity-edited  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC spectrum, and the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts assignments were compiled in Table 1. The substitution positions in the monosaccharide residues were identified from the  $^{13}\text{C}$  glycosylation shifts, and the sequence of sugar residues in the trisaccharide was confirmed using  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC and  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY spectra (see Table 1). Compound 2 is then a  $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  4)-D-Glcp. The reaction yield of the purified compound 2 was 16%, expressed as the percentage of mg of pure trisaccharide obtained relative to the maximum amount expected as described in the experimental section 4.4.1 (10.0 mg of purified compound 2 were obtained from 85.5 mg of lactose, the maximum amount

expected for compound 2 was of 63.0 mg). The purity of this compound was of 89% (calculated from HPLC chromatograms).

The synthesis of the second trisaccharide  $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  X)- $\beta$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  4)-D-Glcp was achieved starting from *o*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG, 3) as the galactosyl donor, cellobiose ( $\beta$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  4)-Glcp, 4) as the acceptor and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL). The reaction was performed at room temperature for 1 h (Scheme 2B). ONPG was used as the galactosyl donor instead of lactose in order to avoid the synthesis of compound 2 (Scheme 2A) as a by-product. Concomitantly, two controls of the reaction synthesis were performed: one of them by incubation of the *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase with ONPG in the absence of cellobiose and the second one, incubating the enzyme with cellobiose in the absence of the galactosyl donor (ONPG).

Fig. 1B shows the TLC profile of the enzymatic synthesis performed in the presence of both ONPG and cellobiose. The spots with Rf 0.79 and 0.29 correspond to the unreacted ONPG and cellobiose respectively, whereas the spot with Rf 0.32 corresponds to galactose, one of the products of the ONPG enzymatic hydrolysis. The other hydrolysis product, *o*-nitrophenol (ONP), is not stained by the carbohydrate specific orcinol reagent. Two spots with Rf values of 0.45 and 0.10 are also observed in the TLC. The former is also detected in the control reaction where the enzyme was incubated with ONPG (3) alone (Fig. 1C). The spots with Rf 0.45 and 0.10 (Fig. 1B), disappeared at longer reaction times, while the intensity of the galactose spot increased (data not shown). This could be due to enzymatic hydrolysis as previously reported for this enzymatic mechanism [31,32]. The spot with the Rf



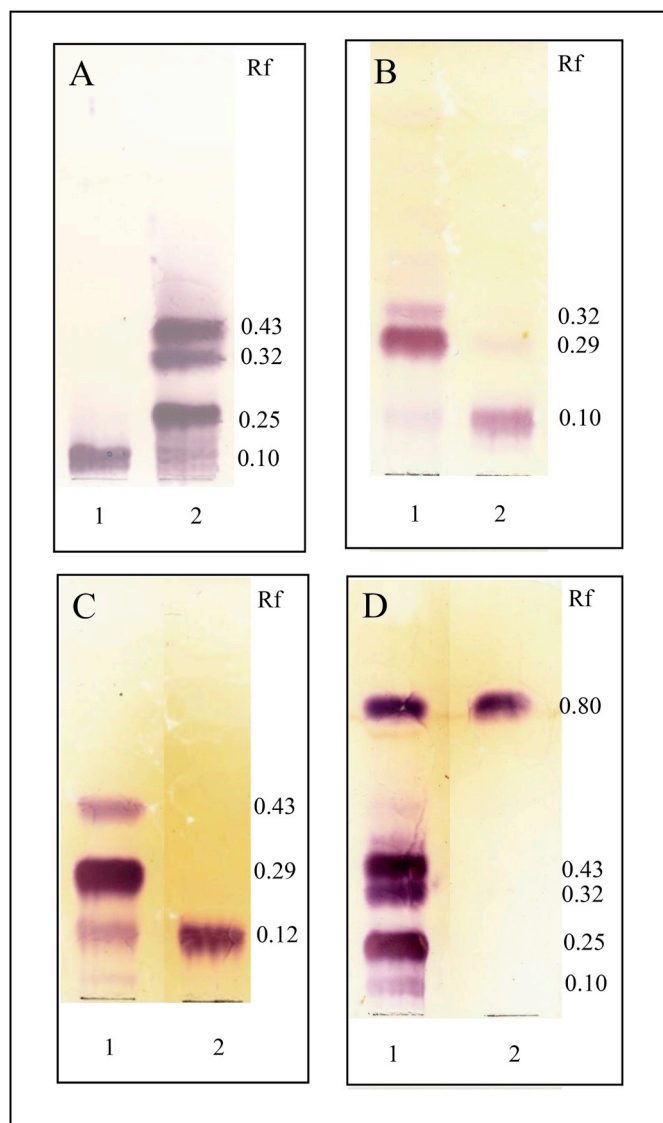
**Fig. 1.** Thin layer chromatography time course reaction synthesis. **A:** Time course reaction starting from lactose (100 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (6 U/mL) at 50 °C. **Lanes:** 1. glucose standard (25 mM), 2. galactose standard (25 mM), 3.0 h, 4.2 h; **B:** Time course reaction starting from cellobiose (200 mM), ONPG (50 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL) at 25 °C. **Lanes:** 1.0 h, 2.1 h; **C:** Time course reaction starting from ONPG (50 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL) at 25 °C. **Lanes:** 1.0 h, 2.1 h; **D:** Time course reaction starting from cellobiose (200 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL) at 25 °C. **Lanes:** 1.0 h, 2.2 h; **E:** Time course reaction starting from lactose (120 mM), benzyl alcohol (240 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (3 U/mL) at 50 °C. **Lanes:** 1.0 h, 2.24 h.

value of 0.10 was purified by preparative TLC, and its purity checked by analytical TLC (Fig. 2B) and HPLC (Figs. S1–B in supplementary material). The resulting material was characterized by NMR spectroscopy (Fig. S2-C and S-2D in supplementary material), revealing a mixture of two trisaccharides (compounds 5 and 6). The assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR resonances of the mixture were carried out in an analogous manner to that described above for compound 2, and their chemical shifts are compiled in Table 2. The substitution positions in the sugar residues were identified from the  $^{13}\text{C}$  glycosylation shifts. Residue **B** in compound 5 is  $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  since  $\Delta\delta_{\text{C}6} = 7.71$  ppm, whereas residue **B** in compound 6 is  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  since  $\Delta\delta_{\text{C}3} = 8.08$  ppm. The sequence of monosaccharides in the respective trisaccharides were determined using  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC and  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY experiments (Table 2). Thus, compound 5 is  $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  4)-D-Glcp and compound 6 is  $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-Glcp-(1  $\rightarrow$  4)-D-Glcp. The ratio of compound 5 and 6 in the mixture (65:35) was estimated by deconvolution and integration of the anomeric proton resonances of residue **B** in the respective trisaccharides. The reaction yield of the purified mixture of regioisomers was of 16% expressed as the percentage of mg of pure trisaccharide obtained relative to the maximum

amount expected, as described in the experimental section 4.4.2 (4 mg of purified mixture of compounds 5 and 6 were obtained from 15 mg of ONPG, the maximum amount expected for the mixture of compounds 5 and 6 was of 25 mg). The Purity of the mixture of compounds 5 + 6 was of 98% (calculated from HPLC chromatograms).

The analysis of the synthesis performed only in the presence of the galactosyl donor (ONPG) showed several spots (Fig. 1C). The spots with Rf 0.79 and 0.32 correspond to the residual ONPG and galactose from the ONPG hydrolysis, respectively. The spot with Rf 0.45 could be attributed to a compound generated due to the transfer of a galactose unit from an ONPG molecule to a second ONPG molecule, catalyzed by the  $\beta$ -galactosidase. This is reinforced by the fact that this spot is stained by a specific developer for nitro groups (data not shown). The expected structure of this compound would be:  $\beta$ -D-Galp-(1  $\rightarrow$  X)- $\beta$ -D-Galp-o-nitrophenol. The elucidation of this compound was beyond the scope of this work, so it was not purified for its identification.

Even though no enzymatic reaction was expected to take place when the  $\beta$ -galactosidase was incubated only with cellobiose, three spots could be observed in the TLC (Fig. 1D): one of them with an Rf value of 0.29 (corresponding to cellobiose), another one with an Rf



**Fig. 2.** Thin layer chromatography of purified compounds. **A:** Purified compound 2 from the synthesis starting from lactose (100 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (6 U/mL) at 50 °C. **Lanes:** 1. purified compound 2, 2.2 h reaction synthesis; **B:** Purified compounds 5 + 6 from the synthesis starting from cellobiose (200 mM), ONPG (50 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL) at 25 °C. **Lanes:** 1.1 h reaction synthesis, 2. purified compound 5 + 6; **C:** Purified compound 7 from the synthesis starting from cellobiose (200 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL) at 25 °C. **Lanes:** 1.24 h reaction synthesis, 2. purified compound 7; **D:** Purified compound 9 from the synthesis starting from lactose (120 mM), benzyl alcohol (240 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (3 U/mL) at 50 °C. **Lanes:** 1.24 h reaction synthesis, 2. purified compound 9.

0.43 (corresponding to glucose) and a third one with a Rf of 0.12. This result could indicate that either *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase is a promiscuous enzyme, which also accepts cellobiose as substrate, or that the commercial *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase used may be contaminated with a  $\beta$ -glucosidase. Either way, a glucose moiety is transferred from a cellobiose molecule to another one generating a trisaccharide with the following structure:  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ X)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp. Simultaneously a glucose moiety is released (Scheme 2C). However, this compound was not synthesized when the enzymatic synthesis was performed in the presence of ONPG and cellobiose, and consequently no glucose was released (Fig. 1B). This evidence that in our reaction conditions the by-side reaction that generates this compound did not take place.

The compound with Rf 0.12 was purified by size exclusion chromatography as described in the experimental section, and its purity checked by analytical TLC (Fig. 2C) and HPLC (Figs. S1–C in supplementary material). The grade of purity was of 91% (calculated from the HPLC chromatograms). The purified compound (7) was identified using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy (Table 3, Fig. S2-E and S2-F in supplementary material) and the CASPER program [33,34]. The correlation patterns observed in the  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY spectra recorded with a mixing time of 100 ms confirmed that all three residues have the *gluco*-configuration. Residues B and C (H1 at 4.50 and 4.52 ppm, respectively) are  $\beta$ -linked since  $^3J_{\text{H1,H2}}$  is 8.0 Hz in both cases. The  $^1\text{H}$  resonances attributed to each monosaccharide spin system were correlated to their respective carbon resonances using a multiplicity-edited  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC spectrum. The unassigned one-bond proton-carbon correlations of residues A $_{\beta}$ , B and C were used as input information in the CASPER program, as well as information of the identity of the three monosaccharide, the linkage positions of the terminal monosaccharides, and the  $^3J_{\text{H1,H2}}$ . In this case, the top ranked structure proposed by the CASPER program was  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glcp. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts assignments carried out using the program CASPER are consistent with the data obtained from  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY and  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY experiments (Table 3); thus, compound 7 is  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp. In order to analyze whether the sugar moiety linked to the terminal galactose could be replaced by an aromatic ring we performed the enzymatic synthesis of benzyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (Scheme 2D). It was synthesized in a similar way as previously reported by Nilsson et al. [35], but using *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (3 U/mL) instead of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase. Lactose (1) was used as the galactosyl donor and benzyl alcohol (8) as the acceptor. The reaction was performed at 50 °C for 24 h and the reaction mixture was analyzed by TLC (Fig. 1E). Spots corresponding to the residual lactose (Rf 0.25), as well as the lactose hydrolysis products, glucose (Rf 0.43) and galactose (Rf 0.32) can be observed. A new spot with Rf of 0.80 also appeared, which could be attributed to the expected benzyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (compound 9). This compound was purified by preparative TLC as described in the experimental section and its purity checked by TLC (Fig. 2D) and HPLC (Fig. S1–D in supplementary material) and its structure confirmed by NMR spectroscopy. A mixture of compounds was observed in the  $^1\text{H}$  and multiplicity-edited  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC spectra of the material, but just a single set of resonances was consistent with a carbohydrate moiety ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.46/102.47, 3.54/71.57, 3.61/73.57, 3.92/69.41, 3.67/75.91, 3.67/61.90 and 3.77/61.90). These  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts are consistent with a  $\beta$ -galactopyranose residue ( $^3J_{\text{H1,H2}} = 7.8$  Hz) substituted at the C1 position ( $\Delta\delta_{\text{C1}} = 5.10$  ppm). The aromatic resonances of the benzyl moiety were observed at  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  7.46/130.22 and 7.41/129.89 (5H in total), whereas the CH<sub>2</sub> resonances showed up at  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  4.75/72.19 and 4.95/72.19 ppm. The reaction yield of compound 9 was 27% expressed as the percentage of mg of pure galactoside obtained relative to the maximum amount expected, as described in the experimental section 4.4.3 (9.2 mg of benzyl  $\beta$ -D-galactopyranoside were obtained from 43.5 mg of lactose, the maximum amount of compound 9 expected was of 34.3 mg). The purity of this compound was of 97% (calculated from HPLC chromatograms).

## 2.2. Analysis of galectin-ligand interactions

Based on their biological relevance and their thorough characterization, we selected hGal-1 and hGal-3 as potential targets for the compounds reported herein. The affinity of these galectins for compounds 2, 5 + 6 and 9 was evaluated by means of a competitive solid phase assay (SPA). This assay measures the ability of different compounds to inhibit the association of galectins to an immobilized ligand. Asialofetuin (ASF) was used as the immobilized ligand and lactose as a reference inhibitor. Results were expressed in terms of half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) and Relative Potency to lactose (IC<sub>50</sub>)

**Table 1**

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts (ppm) of the trisaccharide  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (**2**), and inter-residue correlations from  $^1\text{H},^1\text{H-NOESY}$  and  $^1\text{H},^{13}\text{C-HMBC}$  spectra. The spectra were recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $25^\circ\text{C}$  on a Burkert Avance 500MHz spectrometer, equipped with a 5 mm z-gradient TXI probe ( $^1\text{H},^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ).

Residue		$^1\text{H}/^{13}\text{C}$						Correlation to atom (from anomeric atom)	
		1	2	3	4	5	6	NOE	HMBC
$\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp}$	$\text{A}_\alpha$	5.21 [3.7]	3.58	3.83	3.65	3.94	~3.86		
		(-0.02)	(0.04)	(0.11)	(0.23)	(0.10)			
		92.54	71.82	72.28	79.99	70.71	60.72		
$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp}$	$\text{A}_\beta$	4.66 [8.0]	3.28	3.65	3.65	3.60	3.79, 3.95		
		(0.02)	(0.03)	(0.15)	(0.23)	(0.14)			
		96.44	74.48	75.24	79.99	75.48	60.88		
$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow$	<b>B</b>	4.45 [7.9]	3.54	3.66	3.96	3.93	3.92, 4.06	H4, $\text{A}_{\alpha/\beta}$	C4, $\text{A}_{\alpha/\beta}$
		(-0.08)	(0.09)	(0.07)	(0.07)	(0.28)			
		103.84	71.55	73.25	69.20	74.71	69.78		H4, $\text{A}_{\alpha/\beta}$
$\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow$	<b>C</b>	4.48 [7.9]	3.54	3.66	3.91	3.70	~3.76	H6a, B; H6b, B	C6, B
		(-0.05)	(0.09)	(0.07)	(0.02)	(0.05)			
		104.08	71.55	73.25	69.32	75.89	61.72		H6a, B; H6b, B
		(6.71)	(-1.41)	(-0.53)	(-0.37)	(-0.04)	(-0.12)		

$^3J_{\text{H1,H2}}$  values are given in hertz in square brackets. Chemical shift differences, as compared to corresponding monosaccharides, are given in parentheses [33].

**Table 2**

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts (ppm) of a mixture of trisaccharides  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (**5**) and  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)-D-Glcp}$  (**6**), and inter-residue correlations from  $^1\text{H},^1\text{H-NOESY}$  and  $^1\text{H},^{13}\text{C-HMBC}$  spectra.

Residue		$^1\text{H}/^{13}\text{C}$						Correlation to atom (from anomeric atom)	
		1	2	3	4	5	6	NOE	HMBC
$\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp}$	$5_{\text{A}\alpha}$	5.21 [3.8]	3.57	3.81	3.63	3.94	~3.86		
		(-0.02)	(0.03)	(0.09)	(0.21)	(0.10)			
		92.69	72.01	72.28	80.34	70.98	60.81		
$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp}$	$5_{\text{A}\beta}$	4.65 [7.9]	3.27	3.62	3.63	3.59	3.75, 3.95		
		(0.01)	(0.02)	(0.12)	(0.21)	(0.13)			
		96.57	74.76	75.34	80.14	75.56	60.96		
$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp(-1}\rightarrow$	$5_{\text{B}}$	4.51 [8.0]	3.32	~3.51	3.49	3.66	3.85, 4.23	H4, $5_{\text{A}\beta}$	C4, $5_{\text{A}\beta}$
		(-0.13)	(0.07)	(0.01)	(0.07)	(0.20)			
		103.62	73.93	76.26	70.34	75.70	69.55		H4, $5_{\text{A}\beta}$
$\beta\text{-D-Galp(-1}\rightarrow$	$5_{\text{C}}$	4.45 [7.9]	3.55	~3.66	3.91	3.69	~3.75	H6a, $5_{\text{B}}$ ; H6b, $5_{\text{B}}$	C6, $5_{\text{B}}$
		(-0.08)	(0.10)	(0.07)	(0.02)	(0.04)			
		104.22	71.69	73.52	~69.47	76.03	61.89		H6a, $5_{\text{B}}$ ; H6b, $5_{\text{B}}$
		(6.85)	(-1.27)	(-0.26)	(-0.22)	(0.10)	(0.05)		
$\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glcp}$	$6_{\text{A}\alpha}$	5.21 [3.8]	3.57	3.81	3.64	3.94	~3.86		
		(-0.02)	(0.03)	(0.09)	(0.22)	(0.10)			
		92.69	72.01	72.28	79.45	70.86	60.79		
$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp}$	$6_{\text{A}\beta}$	4.65 [7.9]	3.27	3.62	3.64	3.59	3.75, 3.95		
		(0.01)	(0.02)	(0.12)	(0.22)	(0.13)			
		96.63	74.69	75.17	79.45	75.67	60.92		
$\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Glcp(-1}\rightarrow$	$6_{\text{B}}$	4.54 [7.9] <sup>a</sup>	3.51	3.77	3.52	~3.51	3.74, 3.91	H4, $6_{\text{A}\beta}$	C4, $6_{\text{A}\beta}$
		(-0.10)	(0.26)	(0.27)	(0.10)	(0.05)			
		103.18	73.82	84.84	68.97	76.42	61.45		H4, $6_{\text{A}\beta}$
$\beta\text{-D-Galp(-1}\rightarrow$	$6_{\text{C}}$	4.66 [7.8]	~3.57	3.66	3.91	3.71	~3.75	H3, $6_{\text{B}}$	C3, $6_{\text{B}}$
		(0.13)	(0.12)	(0.07)	(0.02)	(0.06)			
		104.16	72.09	73.44	~69.47	76.19	61.95		
		(6.79)	(-0.87)	(-0.34)	(-0.22)	(0.26)	(0.11)		

$^3J_{\text{H1,H2}}$  values are given in hertz in square brackets. Chemical shift differences, as compared to corresponding monosaccharides, are given in parentheses [33].

<sup>a</sup> This chemical shift correspond only to residue  $6_{\text{B}\beta}$ , since the anomeric proton of residue  $6_{\text{B}\alpha}$  can be seen at 4.51 ppm, and correlates to a carbon at 80.66 ppm ( $\text{C}_4, 6_{\text{A}\alpha}$ ) in the HMBC spectrum.

lactose/IC50 compound). A lower value for IC50 evidences a higher ability of the ligand to work as an inhibitor of Gal-1/3-ASF interaction. All compounds tested showed a higher IC50 value than lactose, entailing a lower inhibitory potency compared to this reference inhibitor (Table 4).

As demonstrated by IC50 values, compound **2** and the mixture of compounds **5** + **6** showed a similar performance inhibiting hGal-1-ASF interactions; however compound **2** was more efficient than the mixture of **5** + **6** for inhibiting hGal-3. On other hand, compound **9**,

**Table 3**  
<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts (ppm) of the trisaccharide β-D-Glcp-(1 → 6)-β-D-Glcp-(1 → 4)-D-Glcp (7), and inter-residue correlations from <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-NOESY spectra.

Residue		<sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C						Correlation to atom (from anomeric atom)
		1	2	3	4	5	6	NOE
→4)-α-D-Glcp	A <sub>α</sub>	5.21 [3.8]	3.57	3.82	3.63	3.94	~3.86	
		(-0.02)	(0.03)	(0.10)	(0.21)	(0.10)		
		92.84	72.10	72.44	80.25	70.96	60.87	
→4)-β-D-Glcp	A <sub>β</sub>	(-0.15)	(-0.37)	(-1.34)	(9.54)	(-1.41)	(-0.97)	
		4.65 [8.0]	3.28	3.63	3.65	3.60	3.80, 3.94	
		(0.01)	(0.03)	(0.13)	(0.23)	(0.14)		
→6)-β-D-Glcp-(1→	B	96.72	74.83	75.43	79.40	75.70	60.93	
		(-0.12)	(-0.37)	(-1.33)	(8.69)	(-1.06)	(-0.91)	
		4.50 [8.0]	~3.32	~3.50	~3.49	3.66	3.87, 4.21	H4, A <sub>β</sub>
β-D-Glcp-(1→	C	(-0.14)	(0.07)	(0.00)	(0.07)	(0.20)		
		~103.64	~74.05	~76.47	70.38	75.74	69.61	
		(6.80)	(-1.15)	(-0.29)	(-0.33)	(-1.02)	(7.77)	
β-D-Glcp-(1→	C	4.52 [8.0]	~3.32	~3.50	3.40	3.45	3.72, 3.91	H6a, B; H6b, B
		(-0.12)	(0.07)	(-0.05)	(-0.02)	(0.04)		
		~103.64	~74.05	~76.47	70.51	76.88	61.60	
		(6.80)	(-1.15)	(-0.29)	(-0.20)	(0.12)	(-0.24)	

<sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub> values are given in hertz in square brackets. Chemical shift differences, as compared to corresponding monosaccharides, are given in parentheses [33].

**Table 4**  
Solid phase inhibition assay between hGal-1 and hGal-3 and ligands.

Galectin	Compound	Valency	IC50 (mM)	Rel. Pot.
Gal-1	1	1	1,4 ± 1,0	1,00
	2	1	4,4 ± 1,4	0,32
	5 + 6	1	4,9 ± 1,2	0,29
	9	1	15,4 ± 1,5	0,09
Gal-3	1	1	2,8 ± 1,3	1,00
	2	1	7,3 ± 1,3	0,38
	5 + 6	1	12,5 ± 1,4	0,22
	9	1	53,3 ± 1,7	0,05

The ability of each of the synthesized ligands to inhibit the binding of hGal-1 or hGal-3 to ASF was evaluated by a solid phase inhibition assay. IC50 was defined as the amount of ligand necessary to achieve 50% binding inhibition.

Rel. Pot. was defined as the ratio IC50<sub>lactose</sub>/IC50<sub>compound</sub>.

presenting an aromatic ring as an aglycone, resulted in a higher IC50 than the other ligands both for hGal-1 and hGal-3. In order to further analyze the glycan binding preferences of hGal-1 and hGal-3, we performed *in silico* analyzes of the glycan-galectin complexes.

### 2.3. Computational modeling of CRD and molecular docking experiments

#### 2.3.1. Comparison of galectins

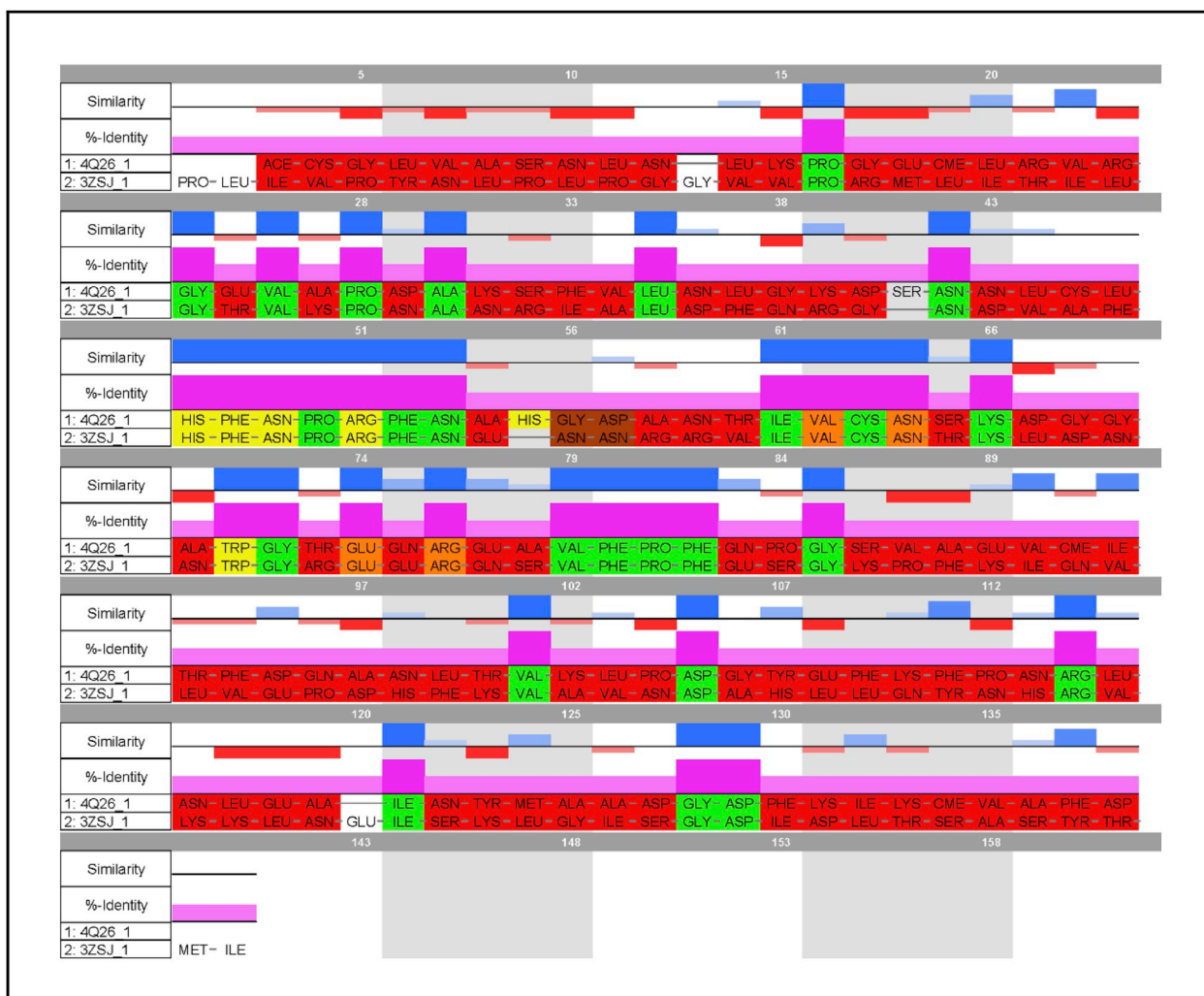
The prepared models of the CRD of hGal-1 (PDB id 4Q26) and hGal-3 (PDB id 3ZSJ) were aligned and superposed in MOE 2015.10.01 (MOE) [36]. The sequence similarity and identity percentages respect to those of hGal-1 were calculated (Fig. 3). Those residues belonging to the subsite C, *i.e.* the actual β-galactoside binding site of galectins, are conserved in both galectins, with exception of His52, which is absent in hGal-3. Subsite D is known for being the binding site for the second carbohydrate linked to the anomeric carbon of the galactose residue. Several residues of subsites D are identical in hGal-1 and hGal-3, except for Gly53 and Asp54 in hGal-1, which are replaced by Asn166 and Asn167 in hGal-3, respectively. This could be an indication of a modified selectivity for carbohydrates between both galectins. Besides the sequence superposition analysis, the three-dimensional structures of hGal-1 and hGal-3 are also similar in particular those residues recognized as part of the subsite C (Fig. 4). Considering that both galectins share common features as well as have differences in the binding site, this would allow for the development of dual inhibitors as well as selective ligands for each galectin [37–40].

#### 2.3.2. Ligand docking and analysis of the protein-ligand complexes

Five compounds (1, 2, 5, 6 and 9) were computationally docked into the binding site of human galectins 1 and 3. The *in silico* approach allows to gain insights into the structural requirements for interactions between carbohydrates and galectins. As described in the experimental section, all docking experiments were performed using Schrödinger, through the Maestro interface (Maestro V.10.3; New York, 2015).

Best scored poses for each ligand were selected and further analyzed, by comparison of the calculated induced fit docking score (IFD Score). The IFD Score available in Prime involves a MM-GBSA calculation in order to estimate the binding free energy [41]. Prime MM-GBSA binding energy does not incorporate entropy terms related to the ligand (conformational entropy), but solvent entropy is included in the model. Following docking, each resulting carbohydrate-galectin complex was further refined by a final energy minimization (RMS gradient of 0.01 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>) using the LigX interface in MOE. In this calculation, the protein atoms far from the ligand were kept fixed, while receptor atoms in the binding site (defined at a distance of 8 Å from the ligand) were treated as mobile. Several properties were calculated after energy minimization, including binding affinity (reported in units of kcal mol<sup>-1</sup>). The binding affinity is calculated employing the GBVI/WSA dG scoring function, which is a force field-based scoring function, which estimates the free energy of binding of the ligand from a given pose. After refinement, we also analyzed the carbohydrate-galectin interactions for all models. Results are summarized in Table 5.

First, we analyzed the main interactions between hGal-1 and hGal-3 and all considered ligands. Ligand interactions diagrams for hGal-1 and hGal-3 are included in Figs. 5 and 6 respectively, as well as in Figs. S3 and S4 in the supplementary material. It has been described that the main interactions between carbohydrates and hGal-1 are a network of hydrogen bonds between polar residues and carbohydrate oxygen atoms. In addition, even though carbohydrates are highly hydrophilic molecules, CH groups (usually located in one face of the carbohydrate ring) can interact with aromatic rings through π-H interactions [8,19]. For ligand 1 (lactose) mostly all expected interactions with hGal-1 are present (Fig. 5A and S3-A in the supplementary material). These interactions include several hydrogen bonds with residues belonging to subsites C and D. Regarding subsite C, two hydrogen bonds are formed between galactose O4 and both His44 and Arg48. Concerning galactose moiety, O5 is forming hydrogen bond with Arg48, while O6 is interacting with Asn61 and Glu71. Also, the characteristic arene-hydrogen interaction between Trp68 and galactose is observed. Additional hydrogen bond interactions are observed between hGal-1 and the glucose moiety, namely O2 with Glu71 and Arg73 and O3 with Arg48 and



**Fig. 3.** Sequence alignment and analysis of hGal-1 (4Q26) and hGal-3 (3ZSJ). Sequence similarity and identity of hGal-3 with respect to hGal-1, were calculated. Blue bars (positive) show similarity and red bars (negative) indicate dissimilar residues. The %-identity of hGal-3 was calculated with respect to hGal-1 and is displayed in magenta bars. Identical residues are highlighted in green, whereas non-identical amino acids are represented in red, except for those residues belonging to the Subsite C and D. Amino acids belonging to Subsite C are highlighted in yellow (identical in all cases), while those belonging to Subsite D are represented in orange (when identical) or brown (when non-identical).

Glu71. As can be seen, our docking results are in perfect agreement with previously reported interactions.

Similar interactions were obtained for compound **2**, **5** and **6** (Fig. 5B–D and S3-B – S3-D in supplementary material). Finally, as expected, for compound **9** (Fig. 5E and S3-E in supplementary material) less interactions were recorded as the compound is lacking of the second carbohydrate and it is replaced by a hydrophobic residue which is lacking of interactions and it is mainly exposed in the CRD.

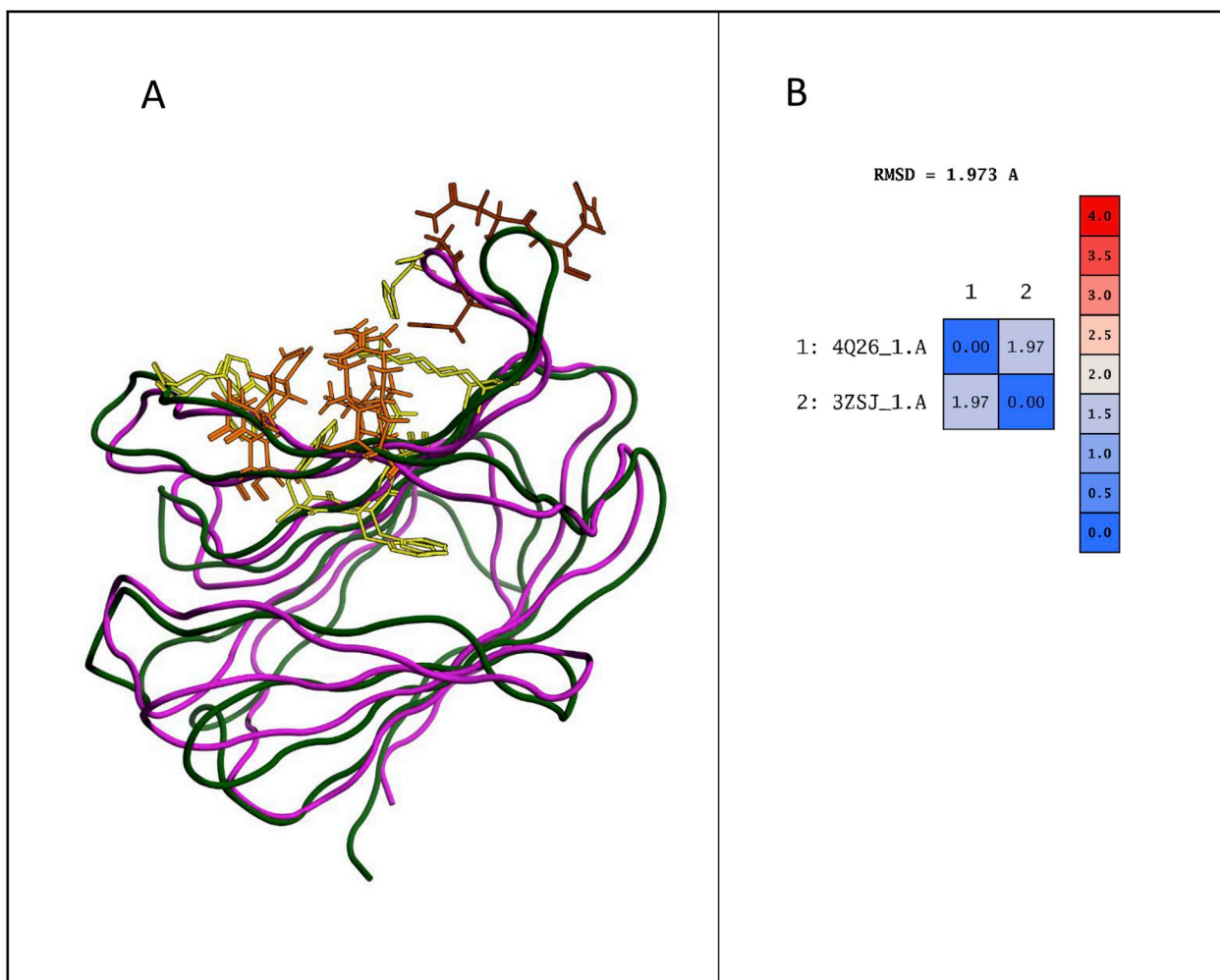
Even though there is less available information regarding interactions between ligands and hGal-3, several interactions are expected, mainly involving amino acids belonging to subsite C, which is conserved between both galectins. Subsite D has differences and this might account for different ligand specificity for hGal-1 and hGal-3.

For lactose (ligand **1**), a hydrogen bond between galactose O4 and Arg162 is observed, while the expected hydrogen bond with His158 is substituted by an arene-hydrogen interaction between the imidazole side chain and O3. Also, the characteristic arene-hydrogen interaction between galactose and Trp181 is observed. Beside these interactions, only two additional hydrogen bonds are present for the glucose moiety, between O3 and Arg162 and Glu184. For hGal-3, different interactions were observed for the assayed compounds, only retaining the characteristic  $\pi$ -hydrogen interaction with Trp181. Several hydrogen bonds

are observed, which are responsible for the stability of the complexes (Fig. 6 and S4 in supplementary material).

### 3. Discussion

In this work we have achieved the enzymatic synthesis of three trisaccharides and a galactoside with good yields (16–27%), considering transglycosylation reactions. In the synthesis of compound **2**, where lactose was the acceptor, a  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6) bond was formed between the transferred galactose and the  $\beta$ -galactose moiety in the lactose disaccharide. Nevertheless, when cellobiose was used as acceptor both  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6) and  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) bonds were formed between the transferred galactose and the non-reducing  $\beta$ -glucose from the cellobiose, leading to compound **5** and **6** respectively. These results suggest that regioselectivity of the *A. oryzae* -galactosidase is influenced by the acceptor structure. In order to establish the relevance of the ligand structure in the strength of the galectin-ligand interaction, we performed experimental and theoretical determinations. Our docking results for hGal-1 suggest the following order of affinity: **1** > **6** > **2** > **5** > **9** (Table 5). These results are in accordance with those reported by Meynier et al. [8], which showed that the presence of a glucose residue linked to galactose (as in compound **1** or **6**) instead of a galactose moiety (as in



**Fig. 4.** (A) superposition of the 3D structures of human galectins; hGal-1 in magenta and hGal-3 in green. Residues belonging to the subsite C are highlighted in yellow. Residues belonging to the subsite D are represented in orange (when identical) or brown (when non-identical). (B) Root-mean square deviation (RMSD) matrix values of the positions of the C $\alpha$  atoms for galectins 1 and 3.

**Table 5**

Induced Fit Docking (IFD) Scores (kcal mol<sup>-1</sup>) and binding affinity (kcal mol<sup>-1</sup>) for tested ligands.

Galectin	Compound	IFD Score	Affinity	IFD Score	Affinity
Gal-1	1	-311.705	-9.04	-311.705	-9.04
	2	-308.187	-7.94	-308.187	-7.94
	5 + 6	-307.679 (5)	-7.78 (5)	-308.291	-7.88 <sup>a</sup>
		-309.211 (6)	-8.03 (6)		
	9	-305.085	-6.19	-305.085	-6.19
Gal-3	1	-319.405	-9.49	-319.405	-9.49
	2	-314.189	-6.36	-314.189	-6.36
	5 + 6	-317.598 (5)	-8.13 (5)	-316.433	-7.97 <sup>a</sup>
		-314.685 (6)	-7.73 (6)		
	9	-310.412	-5.70	-310.412	-5.70

<sup>a</sup> Weighted arithmetic mean.

compound 2), would improve the affinity for the protein. On the other hand, our docking results also show that the ligand affinity decreases when the interglycosidic linkage between the galactose at the non-reducing end and the adjacent glucose is  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6) (as in compound 5) instead of  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) (as in compound 1) or  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) (as in compound 6). This could be due to the fact that changes in the interglycosidic linkages lead to different orientation of the reducing sugar linked to the terminal galactose, changing the network of hydrogens bonds and

consequently the stability of the galectin-ligand complex [22]. When analyzing the docking results for hGal-3 the order of affinity is 1 > 5 > 6 > 2 > 9. Once again the presence of a glucose residue linked to the terminal galactose instead of a galactose moiety improves affinity for this galectin. Yet, regarding the interglycosidic bonds the most favorable one seems to be  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) followed by  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6) and finally  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3). Even though affinities for compounds 5 and 6 were individually obtained, we calculated the weighted arithmetic mean taking into account the experimental ratio (65:35). The average value is listed in the last column of Table 5. In this case, the order of affinity based on our docking results suggest the following order of affinity: 1 > 5 + 6 > 2 > 9 for hGal-3. On the other hand, hGal-1 shows higher affinity for compound 1, followed by compound 2 and the mixture of 5 + 6 with very similar affinity. Once again, the lower affinity was for compound 9. According to experimental results, lactose exhibits the lowest IC<sub>50</sub> both for hGal-1 and hGal-3, confirming that is the best ligand as predicted by theoretical calculations. Experimental IC<sub>50</sub> values for the mixture of 5 + 6 and compound 2 are very similar for hGal-1, confirming theoretical predictions. On the other hand, IC<sub>50</sub> value for compound 2 is slightly lower than for the mixture 5 + 6 for hGal-3. Unlike theoretical data this results suggests that compound 2 would be a better ligand than the mixture of 5 + 6 for hGal-3 (Tables 4 and 5). Even though experimental data does not completely matches theoretical ones, far from being contradictory, these results are complementary. While docking studies calculate ligand-protein affinity

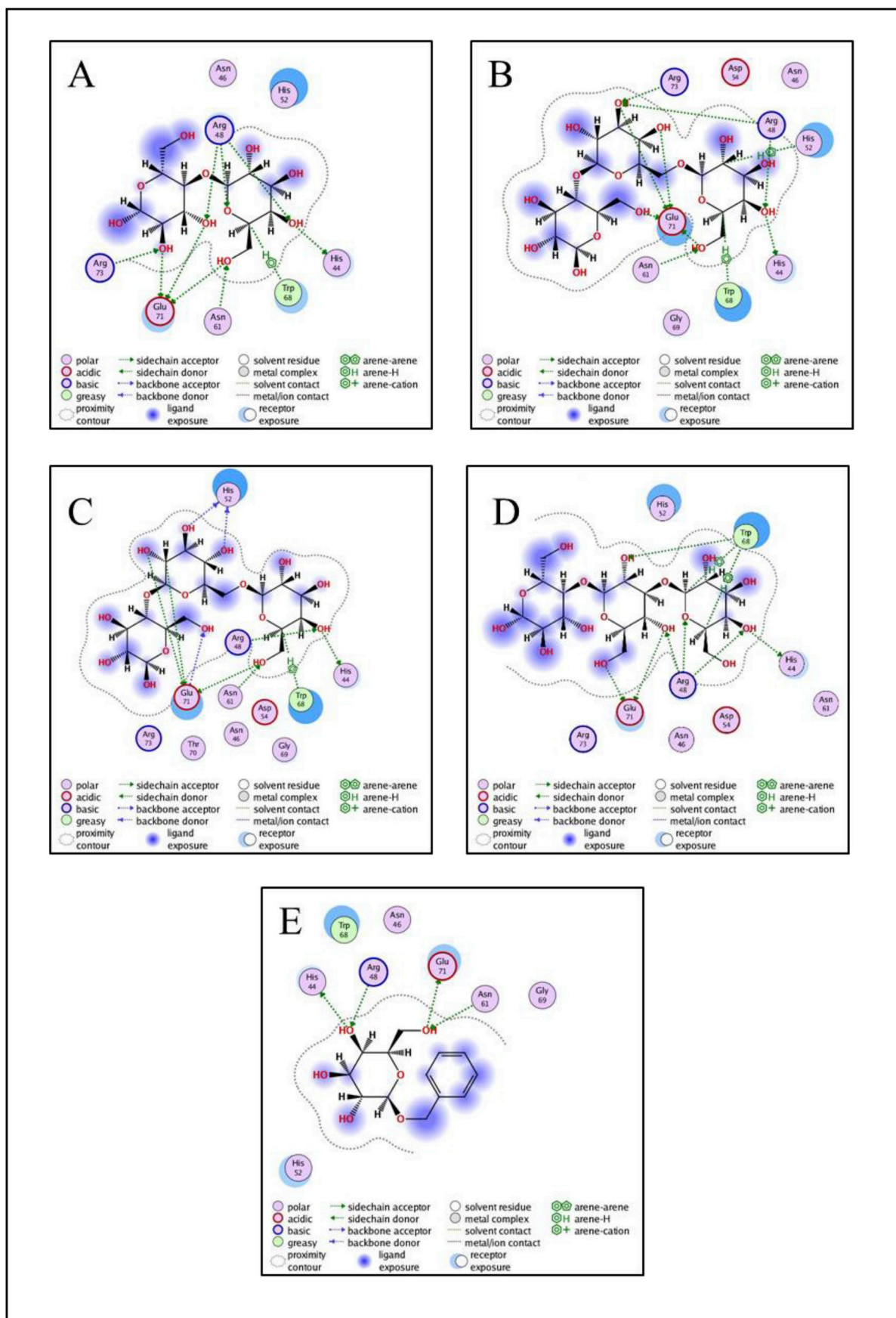


Fig. 5. Ligand interactions between the hGal-1 model and compounds 1 (A), 2 (B), 5 (C), 6 (D) and 9 (E).



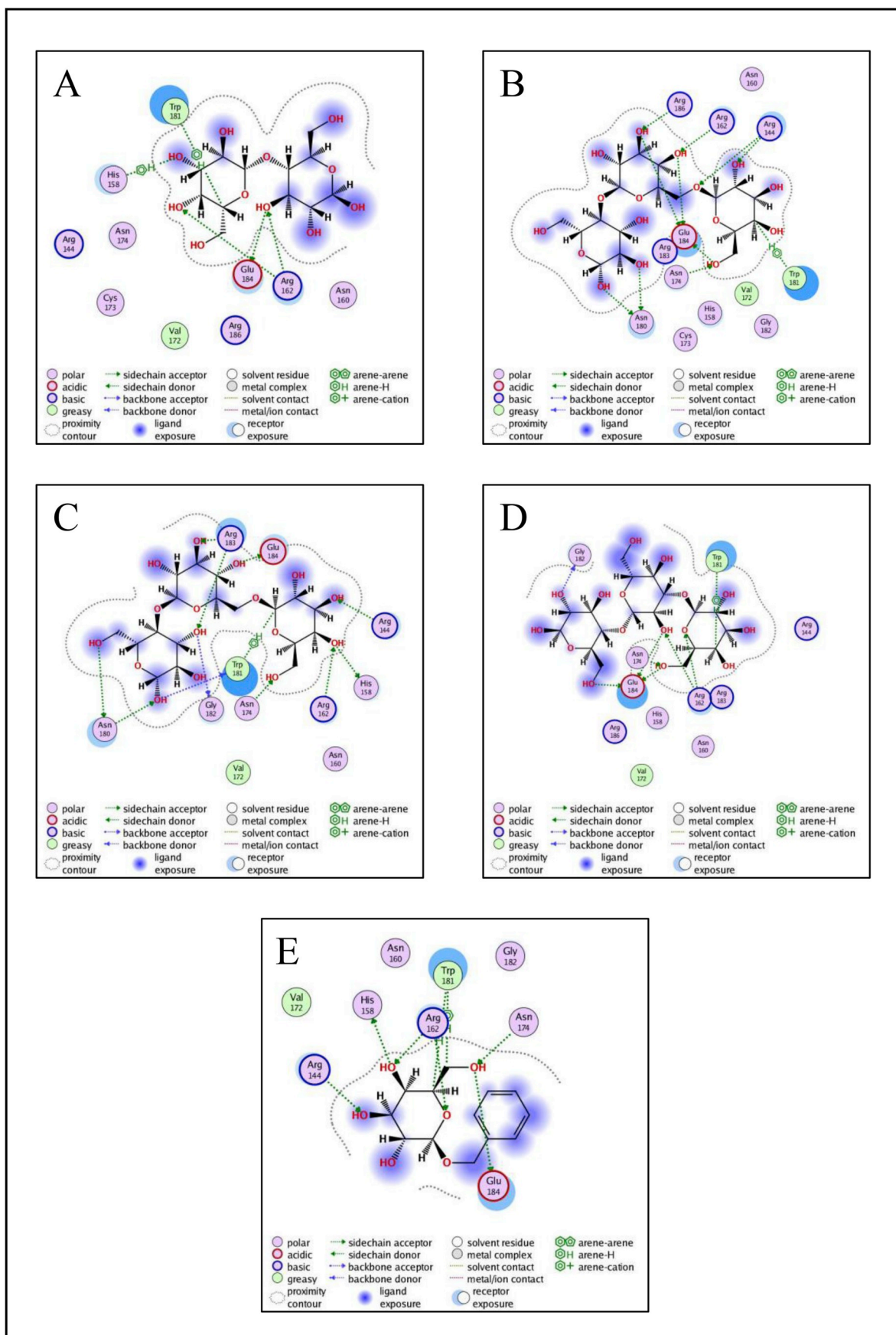


Fig. 6. Ligand interactions between the hGal-3 model and compounds 1 (A), 2 (B), 5 (C), 6 (D) and 9 (E).

based on linkage energy, experimental solid phase assays are competitive assays, where the ability of the ligands to function as inhibitors of hGal-1 or hGal-3 in interaction with asialofetuin is evaluated. Moreover, when evaluating a mixture of regioisomers (as in 5 + 6), the observed performance is not necessarily the result of the weighted arithmetic mean of the performance of the individual compounds. Therefore, and considering that in a biological context these galectins inhibitors act as competitors of natural ligands, docking results prove to be a very good approximation although not necessary match experimental data entirely.

Our results evidence that the induced fit docking with Glide in Schrödinger can single out the correct pose (i.e. conformation and orientation) while avoiding manual docking of carbohydrates, by mapping the site around the crystal ligand and taking into account the receptor flexibility. The correct pose means to single out a conformation and orientation, even if the interactions observed in the crystal structure (of similar ligands) are not present. At this point it should be highlighted that through IFD experiments both the ligand and the receptor are flexible, meaning that the dynamic picture obtained herein might be different from the static picture from a crystal structure. The orientation within the binding site is reproduced, and the receptor is adjusted to the ligand, leading to movements in the side chains which certainly modified some interactions. Regarding scoring, both IFD score as well as affinity follow the experimental trends. This is not usually the case, considering that the binding site of galectins is shallow and the fact that docking algorithms are designed to maximize the number of favorable interactions between the ligand and the receptor. It has been reported that most docking programs fail in identify the best binding mode [42]. Therefore, our results are not only in agreement with the experimental trends but also reproduce the main expected interactions between galectins and carbohydrates.

## 4. Experimental

### 4.1. Materials

*o*-Nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), lactose, cellobiose, galactose, glucose, orcinol, *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23), bovine serum albumin (BSA), tetramethylbenzidine (TMB) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). TLC plates were purchased from Machery Nagel (Duren, Germany). PD-10 (Sephadex G25) columns, Sephadex G-10 were purchased from GE Health Care (Buckinghamshire, UK). BCA protein assay reagents were purchased from Pierce (Rockford, IL). Asialofetuin was obtained by chemical desialylation of fetuin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) with acetic acid 2 M at 80 °C for 2 h. Recombinant human Galectin 1 and Galectin 3 were purchased from Abcam (Cambridge, UK) All other chemicals used were of analytical grade.

### 4.2. $\beta$ -galactosidase activity assay

Aliquots of 100  $\mu$ L of suitably diluted *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase solution were added to 2.0 mL of 25 mM ONPG in 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.5 (activity buffer), at room temperature. The rate of formation of free *o*-nitrophenol (ONP) was recorded spectrophotometrically at 405 nm using a 1 cm path length. One enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme hydrolyzing 1  $\mu$ mol of substrate per minute in the above defined conditions. The extinction coefficient used for ONP at pH 5.5 was  $7.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Enzyme activity was expressed as U/mL. All activity determinations were performed by triplicate.

### 4.3. Protein determination assay

Protein was determined by the bicinchoninic acid (BCA) assay [43]. All protein determinations were performed by triplicate.

## 4.4. Synthesis of trisaccharides and galactosides

Enzymatic syntheses of trisaccharides and galactosides were performed using lactose or ONPG as galactosyl donor and different acceptors (lactose, cellobiose, benzyl alcohol). Details are described below for each synthesis.

### 4.4.1. Synthesis of $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (2)

A mixture containing lactose (100 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (6 U/mL) in activity buffer was incubated under mild stirring at 50 °C for 2 h. The enzymatic reaction was stopped by heating, at 100 °C for 5 min, and analyzed by TLC and HPLC as described in sections 4.5. and 4.7 respectively. Compound 2 was purified by size exclusion chromatography using an ÄKTA Purifier System (GE Healthcare) equipped with Sephadex G10 column (2.6 cm id  $\times$  80 cm) and isocratically eluted with deionized water at a flow rate of 0.10 mL/min (1.1 cm h<sup>-1</sup> linear flow rate). Fractions were collected, lyophilized and purity checked by TLC and HPLC. Reaction yield was expressed as a percentage of the amount of lyophilized pure compound 2 (mg) respect to the maximum amount (mg) expected. Maximum reaction yield would be achieved if all the galactose from 50% of the lactose molecules is transferred to the other 50% of lactose molecules, as lactose functions both as galactose donor and acceptor molecule.

### 4.4.2. Synthesis of $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ X) - $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glcp (5 and 6)

A mixture containing cellobiose (200 mM), ONPG (50 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL) in activity buffer was incubated under mild stirring at room temperature for 1 h. The enzymatic reaction was stopped by heating at 100 °C, for 5 min and analyzed by TLC and HPLC as described in section 4.5 and 4.7 respectively. The mixture of the isomers (compounds 5 and 6) was purified by preparative TLC and purity checked by analytical TLC and HPLC. Reaction yield was expressed as a percentage of the amount of lyophilized pure mixture of compound 5 + 6 (mg) respect to the maximum amount (mg) expected if all the galactose from ONPG molecules is transferred to cellobiose.

**4.4.2.1. Control synthesis.** The following controls syntheses were performed: i) a mixture containing ONPG (50 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL) in activity buffer, and ii) a mixture containing cellobiose (200 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (1 U/mL) in activity buffer, were incubated under mild stirring at room temperature for 1 h. The enzymatic reactions were stopped by heating at 100 °C, for 5 min and analyzed by TLC and HPLC as described in section 4.5. and 4.7 respectively. Compound 7 synthesized in control reaction ii) was purified by size exclusion chromatography employing an ÄKTA Purifier System (GE Healthcare) equipped with Sephadex G10 column (2.6 cm id  $\times$  80 cm) and isocratically eluted with deionized water at a flow rate of 0.10 mL/min (1.1 cm h<sup>-1</sup> linear flow rate). Fractions were collected, lyophilized and purity checked by TLC and HPLC.

### 4.4.3. Synthesis of benzyl $\beta$ -D-galactopyranoside (9)

A mixture containing lactose (120 mM), benzyl alcohol (240 mM) and *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (3U/mL) in activity buffer was incubated under mild stirring at 50 °C for 24 h. The enzymatic reaction was stopped by heating at 100 °C, for 5 min and analyzed by TLC and HPLC as described in section 4.5 and 4.7 respectively. Compound 9 was purified by preparative TLC and purity checked by analytical TLC and HPLC. Reaction yield was expressed as a percentage of the amount of lyophilized pure compound 9 (mg) respect to the maximum amount (mg) expected if all the galactose from lactose molecules is transferred to benzyl alcohol.

## 4.5. Analytical TLC

Analytical TLC was performed on Silica Gel TLC plates. Aliquots of 5  $\mu$ L of samples and standards were spotted onto the TLC plates and

developed to 10 cm in an 22 cm × 11 cm × 6 cm chamber (saturation time 30 min). MeOH:CHCl<sub>3</sub>:C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O:NH<sub>4</sub>OH (42:16:25:16) was used as mobile phase. The TLC plates were air-dried, sprayed with orcinol 0.2% (w/v) in EtOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90:10), and heated at 160 °C.

#### 4.6. Preparative TLC

Aliquots of 100 µL of the reaction mixture were spotted onto a 20 cm × 20 cm silica plate and developed using MeOH:CHCl<sub>3</sub>:C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O:NH<sub>4</sub>OH (42:16:25:16) as mobile phase. In order to identify the area of the plate containing the compound of interest, the edges of the plate were stained with orcinol. The silica from the zone containing the compound of interest was removed and the compound extracted by sonication during 10 min in methanol: water (20:80 v/v) solution. Then the suspension was centrifuged for 10 min at 8700 g. The extraction procedure was repeated three times. The supernatants were pooled, the methanol was evaporated in a vacuum rotary evaporator. The sample was further lyophilized and purity was checked by analytical TLC.

#### 4.7. Analytical HPLC

Analytical HPLC was performed in a Waters High-Performance Liquid Chromatography system equipped with refractive index detector. Either a Shodex Asahiapak NH<sub>2</sub>P50 4E, 4.6 mm i.d. × 250 mm length column or a Luna NH<sub>2</sub>4.6 mm i.d. × 250 mm length column was used. Elution was performed under isocratic conditions with acetonitrile/water (75:25 v/v) at a flow rate of 1 mL/min at 25 °C.

#### 4.8. NMR spectroscopy

The NMR spectra were recorded in D<sub>2</sub>O solution (~0.55 mL) at 25 °C on a Bruker Avance III 500 MHz spectrometer equipped with a 5 mm Z-gradient TXI (<sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N) probe. The <sup>1</sup>H chemical shifts are reported in ppm using the residual signal of HDO as reference (δ<sub>H</sub> 4.77) [44]. The <sup>13</sup>C NMR chemical shifts are also reported in ppm, and the CASPER simulated data for the anomeric carbon of the monosaccharides located at the terminal non-reducing end of the respective trisaccharides was used as reference (104.08, 104.22 and 103.64 ppm in the case of compounds 2, 5 and 7, respectively) [33,34].

#### 4.9. Molecular modeling

##### 4.9.1. Protein and ligand preparation

Induced fit docking experiments were performed using Schrödinger 2015-4, employing the Maestro graphical interface (Maestro V.10.3; New York, 2015). All systems (hGal-1, hGal-3, and ligands) were prepared in Maestro. In total, a small database of 5 potential galectin ligands was built and prepared in Schrödinger, considering only the natural stereoisomer for each carbohydrate. Protonation states of the proteins were assigned in accordance to the pK<sub>a</sub> values and a pH of 7. Finally, the structure of the proteins were refined through a restrained minimization using the OPLS2005 molecular mechanics force field to within a rms gradient of 0.1 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>, employing the protein preparation wizard utility embedded in Maestro [45,46].

The protein crystal structures of hGal-1 (PDB id 4Q26) [47] and hGal-3 (PDB id 3ZSJ) [48] were retrieved from the Protein Data Bank (PDB) [49]. Considering the availability of several crystal structures for each galectin, the initial structures were selected based on both high resolution (1.399 Å for hGal-1 and 0.86 Å for hGal-3) and the inclusion of either *N*-acetylglucosamine or lactose in the active site.

##### 4.9.2. Induced fit docking

Induced Fit docking was performed as previously described by Sherman 2006 et al. [50,51]. Docking was performed using a Glide algorithm [52,53], and the docking grid was generated by centering a

box at the centroid of the crystal ligand for each receptor. For each ligand during the docking different ring conformations were sampled in order to account for their flexibility, but keeping only representative conformations (i.e. those having relative energies lower than 2.50 kcal mol<sup>-1</sup> relative to the lowest energy conformation found). A maximum of 20 poses were retained at this stage. Then, a Prime induced fit refinement was performed [54,55]. This stage involves the energy minimization of ligands and amino acids (including optimization of side chains) of all residues within 5.0 Å of ligand poses. Finally, a Glide redocking step was performed using the extra precision Grid-Based Ligand Docking with Energetics (Glide XP) algorithm, which docks ligands flexibly. In XP docking a better correlation between best poses and good scores is achieved, removing false positives [56].

#### 4.10. Solid phase assays

This assay was adapted from Rapaport et al. [57]. Commercial recombinant human Gal-1 and Gal-3 (Abcam, Cambridge, UK) were used. First, 96-well microplates were coated with asialofetuin (10 µg/mL in NaHCO<sub>3</sub> buffer, pH 9.6) and incubated overnight at 4 °C. Then, the plate was washed three times with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween and blocked with PBS containing 2% Bovine Serum Albumin (BSA). Meanwhile, different solutions of the synthetic ligands (0.2–8.0 mM in PBS, containing 0.3% BSA) were incubated (37 °C, 2 h) with hGal-1 (60 µg/mL) or hGal-3 (40 µg/mL). Finally, 50 µL of this solution, containing the galectin and the potential ligands, were added into the asialofetuin-coated wells. The plate was then incubated at 37 °C for 2 h, washed with PBS-Tween 0.05%, and incubated with biotinylated antibodies αhGal-1 or αhGal-3 at room temperature for 1 h. Later on, the plate was washed with PBS-Tween 0.05% and incubated with streptavidin-peroxidase (HRP) in PBS-BSA 0.3% at room temperature for 30 min. The washing step was repeated and binding of hGal-1 or hGal-3 was detected with tetramethylbenzide (TMB) and hydrogen peroxide 30%. The colorimetric reaction was stopped with the addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N and absorbance was measured at 450 and 550 nm.

#### Declarations of interest

None.

#### Fundings

This work was supported by “Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas” (PEDECIBA). CPG scholarship was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay (POS\_NAC\_2015\_1\_109469). CPG intership at IBYME was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Uruguay.

KM and AJC are researchers from the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. This work was supported by a grant from the Argentinean Agency for Promotion of Science and Technology (PICT 2015-0564) to KM. AJC and KM acknowledge support from Sales, Kenneth Rainin and René Baron Foundations.

#### Acknowledgments

P. S.-M. gratefully acknowledge the generous allocation of computing time at C3SE supercomputing center via the Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC) and Prof. Leif A. Eriksson (University of Gothenburg).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.10.011>.

## References

- [1] G.A. Rabinovich, D.O. Croci, Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer, *Immunity* 36 (2012) 322–335, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.004>.
- [2] M.A. Toscano, V.C. Martínez Allo, A.M. Cutine, G.A. Rabinovich, K.V. Mariño, Untangling galectin-driven regulatory circuits in autoimmune inflammation, *Trends Mol. Med.* 24 (4) (2018) 348–363, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.008>.
- [3] J.P. Cerliani, A.G. Blidner, M.A. Toscano, D.O. Croci, G.A. Rabinovich, Translating the 'Sugar Code' into immune and vascular signaling programs, *Trends Biochem. Sci.* 42 (4) (2016) 255–273, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.11.003>.
- [4] G.A. Rabinovich, M.A. Toscano, Turning sweet on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (5) (2009) 338–352, <https://doi.org/10.1038/nri2536>.
- [5] G.F. Audette, L.T.J. Delbaere, J. Xiang, Mapping protein: carbohydrate interactions, *Curr. Protein Pept. Sci.* 4 (2003) 11–20, <https://doi.org/10.2174/1389203033380322>.
- [6] G.R. Vasta, Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution, *Adv. Exp. Med. Biol.* 946 (2012) 21–36, [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_2).
- [7] J. Hirabayashi, T. Hashidate, Y. Arata, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, T. Urashima, T. Oka, M. Futai, W.E.G. Muller, F. Yagi, K. Kasai, Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 232–254, [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00311-2).
- [8] C. Meynier, M. Feracci, M. Espeli, F. Chaspoul, P. Gallice, C. Schiff, F. Guerlesquin, P. Roche, NMR and MD investigations of human Galectin-1/oligosaccharide complexes, *Biophys. J.* 97 (2009) 3168–3177, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.026>.
- [9] D. Giguère, R. Patnam, M.-A. Bellefleur, C. St-Pierre, S. Sato, R. Roy, Carbohydrate triazoles and isoxazoles as inhibitors of galectins-1 and -3, *Chem. Commun.* (22) (2006) 2379–2381, <https://doi.org/10.1039/B517529A>.
- [10] J. Tejler, H. Leffler, U.J. Nilsson, Synthesis of O-galactosyl aldoximes as potent LacNAc-mimetic galectin-3 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 15 (2005) 2343–2345, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.02.079>.
- [11] I. Cumpstey, S. Carlsson, H. Leffler, U.J. Nilsson, Synthesis of a phenyl thio-β-D-galactopyranoside library from 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene: discovery of efficient and selective monosaccharide inhibitors of galectin-7, *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 1922–1932, <https://doi.org/10.1039/B502354H>.
- [12] S.P. Méndez-Huergo, A.G. Blidner, G.A. Rabinovich, Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis, *Curr. Opin. Immunol.* 45 (2017) 8–15, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.12.003>.
- [13] R. Téllez-Sanz, L. García-Fuentes, A. Vargas-Berenguel, Human galectin-3 selective and high affinity inhibitors. Present state and future perspectives, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 2979–2990, <https://doi.org/10.2174/09298673113209990163>.
- [14] J.M. Romero, M. Trujillo, D.A. Estrin, G.A. Rabinovich, S. Di Lella, Impact of human galectin-1 binding to saccharide ligands on dimer dissociation kinetics and structure, *Glycobiology* 26 (12) (2016) 1317–1327, <https://doi.org/10.1093/glycob/cww052>.
- [15] D. Solís, J. Jiménez-Barbero, M. Martín-Lomas, T. Díaz Mauri, Probing hydrogen-bonding interactions of bovine heart galectin-1 and methyl β-lactoside by use of engineered ligands, *Eur. J. Biochem.* 223 (1994) 107–114, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18971.x>.
- [16] P. Vidal, V. Roldós, M.C. Fernandez-Alonso, B. Vauzeilles, Y. Blierot, F.J. Cañada, S. André, H.-J. Gabius, J. Jimenez-Barbero, J.F. Espinosa, S. Martín-Santamaría, Conformational selection in glycomimetics: human galectin-1 only recognizes syn-Ψ-type conformations of β-1,3-linked lactose and its C-glycosyl derivative, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 14581–14590, <https://doi.org/10.1002/chem.201301244>.
- [17] A.J. Cagnoni, J. Kovensky, M.L. Uhrig, Design and synthesis of hydrolytically stable multivalent ligands bearing thiodigalactoside analogues for peanut lectin and human Galectin-3 binding, *J. Org. Chem.* 79 (2014) 6456–6467, <https://doi.org/10.1021/jo500883v>.
- [18] L. Ingrassia, I. Camby, F. Legrand, V. Mathieu, P. Nshimyumukiza, F. Darro, R. Kiss, Anti-Galectin compounds as potential anti-cancer drugs, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 3513–3527, <https://doi.org/10.2174/092986706779026219>.
- [19] C. Meynier, F. Guerlesquin, P. Roche, Computational studies of human Galectin-1: role of conserved tryptophan residue in stacking interaction with carbohydrate ligands, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27 (1) (2009) 49–57, <https://doi.org/10.1080/07391102.2009.10507295>.
- [20] E. Salomonsson, A. Larumbe, J. Tejler, E. Tullberg, H. Rydberg, A. Sundin, T. Frejd, Y.D. Lobsanov, J.M. Rimi, U.J. Nilsson, H. Leffler, Monovalent interaction of galectin-1, *Biochemistry* 49 (2010) 9518–9532, <https://doi.org/10.1021/bi1009584>.
- [21] A.J. Noll, J.-P. Gourdiere, Y. Yu, Y. Lasanajak, D.F. Smith, R. Cummings, Galectins are human milk glycan receptors, *Glycobiology* 26 (6) (2016) 655–669, <https://doi.org/10.1093/glycob/cww002>.
- [22] T.-J. Hsieh, H.-Y. Lin, Z. Tu, B.-S. Huang, S.C. Wu, C.-H. Lin, Structural basis underlying the binding preference of human galectins-1, -3 and -7 for Galβ1-3/4GlcNAc, *PLoS One* 10 (5) (2015) e0125946, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125946>.
- [23] A.J. Cagnoni, J.M. Pérez Sáez, G.A. Rabinovich, K.V. Mariño, Turning-off signaling by Siglecs, Selectins and Galectins: chemical inhibition of glycan-dependent interactions in cancer, *Front. Oncol.* 6 (2016) 109, <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00109>.
- [24] Y. Ichikawa, G.C. Look, C.H. Wong, Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis, *Anal. Biochem.* 202 (1992) 215–238, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90099-S](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90099-S).
- [25] F. van Rantwijk, M. Woudenberg-van Oosterom, R.A. Sheldon, Glycosidase-catalyzed synthesis of alkyl glycosides, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 6 (1999) 511–532, [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00042-9).
- [26] P. Bojarová, V. Kren, Glycosidases: a key to tailored carbohydrates, *Trends Biotechnol.* 27 (4) (2009) 199–209, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.12.003>.
- [27] C. Bayón, A. Cortés, J. Berenguer, M.J. Hernáiz, Highly efficient enzymatic synthesis of Galβ-(1→3)-GalNAc and Galβ-(1→3)-GlcNAc in ionic liquids, *Tetrahedron* 69 (24) (2013) 4973–4978, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.04.015>.
- [28] N. Albayrak, S.-T. Yang, Productions of oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β-galactosidase immobilized on cotton cloth, *Biotechnol. Bioeng.* 77 (1) (2002) 8–19, <https://doi.org/10.1002/bit.1195>.
- [29] P. Urrutia, B. Rodríguez-Colinas, L. Fernández-Arrojo, A.O. Ballesteros, L. Wilson, A. Illanes, F.J. Plou, Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 1081–1087, <https://doi.org/10.1021/jf304354u>.
- [30] G. Irazoqui, C. Giacomini, F. Batista-Viera, B.M. Brena, A. Cardelle-Cobas, N. Corzo, M.L. Jimeno, Characterization of galactosyl derivatives obtained by transgalactosylation of lactose and different polyols using immobilized β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *J. Agric. Food Chem.* 57 (23) (2009) 11302–11307, <https://doi.org/10.1021/jf901834k>.
- [31] C. Porciúncula González, A. Castilla, L. Garófalo, S. Soulé, G. Irazoqui, C. Giacomini, Enzymatic synthesis of 1-(2-aminoethyl)-β-D-galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus oryzae*, *Carbohydr. Res.* 368 (2013) 104–110, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.12.009>.
- [32] C. Porciúncula González, E. Rodríguez, S. Soule, L. Franco Fraguas, B.M. Brena, C. Giacomini, G. Irazoqui, Enzymatic synthesis of 3-aminopropyl-1-O-β-D-galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus oryzae* β-galactosidase, *Biocatal. Biotransform.* 33 (2015) 197–207, <https://doi.org/10.3109/10242422.2015.1095678>.
- [33] P.-E. Jansson, L. Kenne, G. Widmalm, Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using 1H- and 13C-N.M.R. data, *Carbohydr. Res.* 188 (1989) 169–191, [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)84069-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84069-8).
- [34] M. Lundborg, G. Widmalm, Structural analysis of glycans by NMR chemical shift prediction, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1514–1517, <https://doi.org/10.1021/ac1032534>.
- [35] K.G.I. Nilsson, A simple strategy for changing the regioselectivity of glycosidase-catalyzed formation of disaccharides: part II, enzymic synthesis in situ of various acceptor glycosides, *Carbohydr. Res.* 180 (1988) 53–59, [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80063-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80063-6).
- [36] Molecular Operating Environment (MOE), Chemical Computing Group, Canada, Montreal, QC, 2015.
- [37] C.T. Oberg, S. Carlsson, E. Fillion, H. Leffler, U.J. Nilsson, Efficient and expedient two-step pyranose-retaining fluorescein conjugation of complex reducing oligosaccharides: galectin oligosaccharide specificity studies in a fluorescence polarization assay, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 1289–1297, <https://doi.org/10.1021/bc034130j>.
- [38] D. Giguère, S. Sato, C. St-Pierre, S. Sirois, R. Roy, Aryl O- and S-galactosides and lactosides as specific inhibitors of human galectins-1 and -3: role of electrostatic potential at O-3, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 16 (6) (2006) 1668–1672, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.12.010>.
- [39] D. Giguère, M.-A. Bonin, P. Cloutier, R. Patnam, C. St-Pierre, S. Sato, R. Roy, Synthesis of stable and selective inhibitors of human galectins-1 and -3, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 7811–7823, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.06.044>.
- [40] B.A. Salameh, I. Cumpstey, A. Sundin, H. Leffler, U.J. Nilsson, 1H-1,2,3-Triazol-1-yl thiodigalactoside derivatives as high affinity galectin-3 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 5367–5378, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.05.040>.
- [41] S. Sirin, R. Kumar, C. Martinez, M.J. Karmilowicz, P. Ghosh, Y.A. Abramov, V. Martin, W. Sherman, A computational approach to enzyme design: predicting ω-aminotransferase catalytic activity using docking and MM-GBSA scoring, *J. Chem. Inf. Model.* 54 (8) (2014) 2334–2346, <https://doi.org/10.1021/ci5002185>.
- [42] M. Agostino, E. Yuriev, P.A. Ramsland, A computational approach for exploring carbohydrate recognition by lectins in innate immunity, *Front. Immunol.* 2 (2011) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00023>.
- [43] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1) (1985) 76–85, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- [44] H.E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities, *J. Org. Chem.* 62 (21) (1997) 7512–7515, <https://doi.org/10.1021/jo971176v>.
- [45] G. Madhavi Sastry, M. Ahzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 27 (2013) 221–234, <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>.
- [46] J.L. Banks, H.S. Beard, Y. Cao, A.E. Cho, W. Damm, R. Farid, A.K. Felts, T.A. Halgren, D.T. Mainz, J.R. Maple, R. Murphy, D.M. Philipp, M.P. Repaski, L.Y. Zhang, B.J. Berne, R.A. Friesner, E. Gallicchio, R.M. Levy, Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT), *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1752–1780, <https://doi.org/10.1002/jcc.20292>.
- [47] C. Grimm, N. Bertleff-Zieschang, Crystal Structure of Galectin-1 in Complex with N-acetylglucosamine, To Be Publ. (n.d.). DOI:10.2210/PDB4Q26/PDB.
- [48] K. Saraboji, M. Hakansson, S. Genheden, C. Diehl, J. Qvist, U. Weininger,

- U.J. Nilsson, H. Leffler, U. Ryde, M. Akke, D.T. Logan, The carbohydrate-binding site in galectin-3 is pre-organized to recognize a sugar-like framework of oxygens: ultra-high resolution structures and water dynamics, *Biochemistry* 51 (2012) 296–306, <https://doi.org/10.1021/bi201459p>.
- [49] PDB, Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- [50] W. Sherman, T. Day, M.P. Jacobson, R.A. Friesner, R. Farid, Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 534–553, <https://doi.org/10.1021/jm050540c>.
- [51] W. Sherman, H.S. Beard, R. Farid, Use of an induced fit receptor structure in virtual screening, *Chem. Biol. Drug Des.* 67 (2006) 83–84, <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2005.00327.x>.
- [52] T.A. Halgren, R.B. Murphy, R.A. Friesner, H.S. Beard, L.L. Frye, W.T. Pollard, J.L. Banks, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring 2. Enrichment factors in database screening, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1750–1759, <https://doi.org/10.1021/jm030644s>.
- [53] R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring 1. Method and assessment of docking accuracy, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1739–1749, <https://doi.org/10.1021/jm0306430>.
- [54] M.P. Jacobson, R.A. Friesner, Z. Xiang, B. Honig, On the role of crystal packing forces in determining protein side-chain conformations, *J. Mol. Biol.* 320 (2002) 597–608, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00470-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00470-9).
- [55] M.P. Jacobson, D.L. Pincus, C.S. Rapp, T.J.F. Day, B. Honig, D.E. Shaw, R.A. Friesner, A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction, *Proteins* 55 (2004) 351–367, <https://doi.org/10.1002/prot.10613>.
- [56] R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz, Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6177–6196, <https://doi.org/10.1021/jm051256o>.
- [57] E.M. Rapoport, T.V. Pochechueva, O.V. Kurmyshkina, G.V. Pazynina, V.V. Severov, E.A. Gordeeva, I.M. Belyanchikov, S. Andre, H.-J. Gabius, N.V. Bovin, Solid-phase assays for study of carbohydrate specificity of galectins, *Biochemistry (Mosc.)* 75 (3) (2010) 310–319, <https://doi.org/10.1134/S0006297910030077>.