ANALISIS CONFORMACIONAL DEL GANGLIOSIDO GD1a POR METODOS MECANICO-MOLECULARES. MODIFICACION DEL PROGRAMA MM2

Ernesto Moreno[1], Roberto Cruz[2], Naipy C. Pérez[2] y Niurka González[2]

[1]*Centro de Inmunología Molecular. P.O. Box 16040. Habana 11600.* [2]*Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nucleares. Ave. Salvador Allende y Luaces. Habana 10600.*

Recibido en septiembre de 1993. Aprobado en Junio de 1994.

Key words: Ganglioside GD1a, conformational analysis, program MM2

SUMMARY

A conformational analysis of the oligosaccharide moiety of the ganglioside GD1a, which is of immunological interest, was performed using the molecular mechanics program MM2. A modification to this program was implemented, which allows to make rigid analyses of geometry and significantly save calculation time. The results were compared with those obtained by other authors using the HSEA program and NMR techniques. Additional information about the mobility of the molecule was obtained by performing relaxed conformational analyses.

RESUMEN

Se realiza el estudio conformacional de la parte oligosacárida del ganglósido GD1a, de interés inmunológico, utilizando el programa mecánico-molecular MM2. Fue realizada una modificación de este programa que permite realizar análisis rígidos de geometría y reducir considerablemente el tiempo de cálculo. Los resultados son comparados con el estudio realizado por otros autores utilizando el programa HSEA y técnicas de RMN. Se obtuvo información adicional sobre la movilidad de la molécula al realizar análisis conformacionales flexibles.

INTRODUCCION

La modelación teórica de moléculas a través de computadoras es una tendencia que se va imponiendo cada vez con más fuerza en las investigaciones médico-biológicas. Entre sus aplicaciones principales se encuentran los estudios conformacionales relacionados con el reconocimiento antígeno-anticuerpo, interacción en la cual es importante la correspondencia entre las estructuras tridimensionales del antígeno y del sitio de unión del anticuerpo.

En los últimos años ha crecido el interés sobre los antígenos de naturaleza carbohidrática, y en particular sobre los gangliósidos, presentes en las mebranas celulares de la mayoría de los vertebrados. Los gangliósidos son moléculas constituidas por una parte lipídica y una parte oligosacárida, y su rasgo distintivo es la presencia de una o más unidades de un tipo singular de azúcar: el ácido siálico (Wiegandt, 1985). Como regla general el estudio conformacional de los gangliósidos se concentra en la parte oligosacárida, pues es la que está expuesta al medio exterior mientras la parte lipídica permanece *anclada* a la membrana celular. Para estos estudios se utilizan fundamentalmente programas mecánico-moleculares, basados en la física clásica (Clark, 1985). Entre los más utilizados internacionalmente se encuentran el HSEA (Hard Sphere Exo-Anomeric) (Lemieux *et al.*, 1980; Thogersen *et al.*, 1982) y el MM2 (Molecular Mechanics) (Clark, 1985; Allinger, 1977; Norskov-Lauritzen y Allinger, 1984). El primero fue diseñado especialmente para carbohidratos y realiza una optimización energética de los enlaces glicosídicos, para obtener la disposición espacial de cada monosacárido dentro del polisacárido. En este programa cada átomo se considera una esfera rígida de un radio de Van der Waals apropiado y se utilizan potenciales parametrizados para interacciones a larga distancia, entre átomos no enlazados. El HSEA, además, considera explícitamente el efecto exo-anomérico propio del enlace glicosídico de los azúcares. Al tener en cuenta un número limitado de grados de libertad el HSEA permite modelar oligosacáridos relativamente grandes con un bajo costo en tiempo de cálculo.

El MM2, por su parte, es un programa más general, parametrizado para una amplia variedad de moléculas. A diferencia del HSEA, el MM2 realiza una optimización completa de la energía molecular al permitir la relajación de todos los grados de libertad, con lo cual los cálculos son más realistas desde el punto de vista físico. Sin embargo, el tiempo de cálculo aumenta cuadráticamente con el número de átomos y se convierte en un impedimento cuando este sobrepasa los 100 ó 200, como sucede en el caso de los oligosacáridos.

En este trabajo abordamos el estudio conformacional del ganglósido GD1a, cuya interacción con el sistema inmune resulta de interés. Para ello realizamos una modificación al programa MM2(85), que permite

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

emular parcialmente las ventajas del método de esferas rígidas y combinarlas de forma conveniente con estudios donde se optimiza por completo la geometría. Nuestros resultados son comparados con los obtenidos por Sabesan *et al.* (1991), utilizando el programa HSEA y técnicas de RMN.

MATERIALES Y METODOS

Modificación del MM2: Un nuevo *dihedral driver* rígidomultidimensional

El MM2 incluye una opción llamada "dihedral driver", mediante la cual se pueden escoger hasta dos ángulos torsionales que pueden ser variados de forma independiente, fijando para cada uno un valor inicial, otro final y un incremento. Para cada combinación de estos ángulos el MM2 realiza una optimización del resto de la molécula. Esta opción es utilizada en los análisis conformacionales de disacáridos, rotando alrededor de los angulos ϕ y ψ del enlace glicosídico (figura.1). Los resultados de los cálculos son presentados gráficamente en forma de mapas topográficos de energía en función de los dos ángulos. El MM2 sólo permite construir mapas flexibles (con la geometría optimizada en cada punto), lo cual es demasiado costoso en tiempo de cálculo si se quiere investigar todo el espacio conformacional ϕ/ψ. Un procedimiento más racional consiste en realizar un estudio rígido de todo el espacio ϕ/ψ, escoger las regiones de interés (las de energía más baja) y después investigar más detalladamente estas regiones optimizando la geometría.

Como el MM2 no ofrece la posibilidad de construir mapas rígidos, fue necesario incluirle esa opción. La modificación fue realizada tratando de alterar lo menos posible el código original del programa. Fue creado un nuevo módulo llamado "INIDRIVE", escrito en lenguaje FORTRAN 77. Esta modificación permite la variación simultánea de hasta diez ángulos torsionales, lo que posibilita investigar espacios conformacionales de hasta diez dimensiones. Si se quiere estudiar la influencia de los ángulos torsionales ϕ_1, ϕ_2,..., ϕ_{10}, sobre la energía de la molécula, la nueva rutina genera la geometría correspondiente a cada conjunto de valores de estos párametros y calcula su energía. Esta opción se activa si en la entrada de datos se incluyen simultáneamente

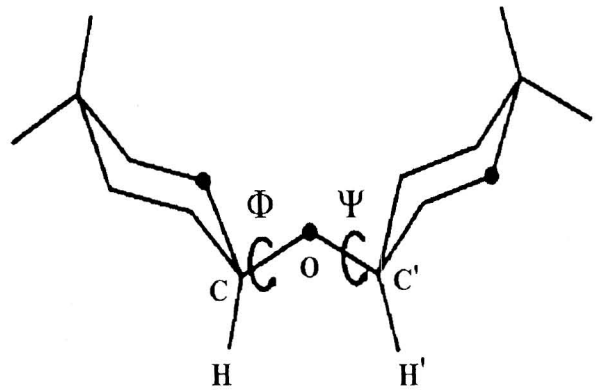


Fig. 1. Esquema de un disacárido donde se muestran los ángulos torsionales ϕ y ψ del enlace glicosídico.

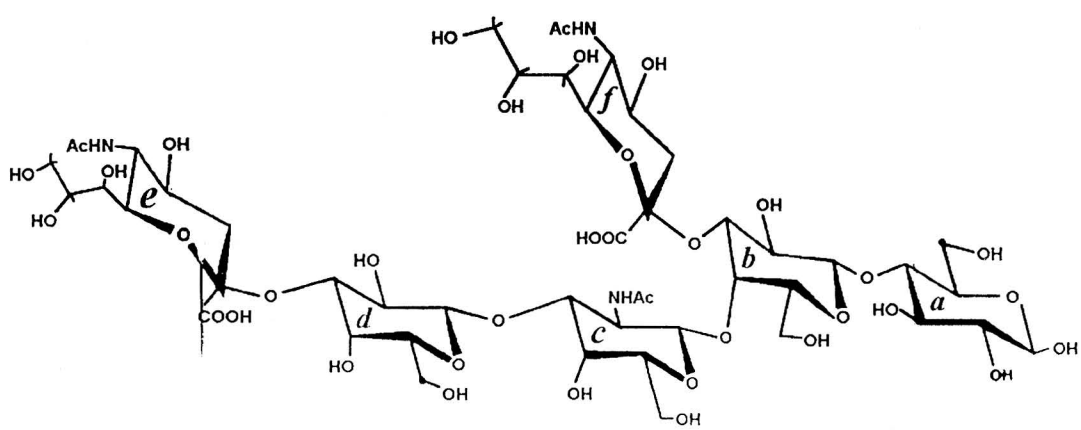
las opciones INIT= 1 y NDRIVE= -1, que antes no eran compatibles. (*MMP2(85) Users Manual,* 1987).

Otros programas y medios utilizados

Las moléculas fueron construídas utilizando los programas Alchemy II (TRIPOS Associates, 1989) y PCMODEL (Serena Software, Bloomington, INC, 1991). Fue desarrollado un paquete de programas interfaces entre estos sistemas y para el procesamiento de los datos de salida del MM2. Los mapas topográficos fueron construídos con el programa SURFER (Golden Software, INC., 1989). Los cálculos fueron realizados en una computadora personal Intel 486 DX /50 MHz, en el Centro de Inmunología Molecular (CIM).

Estudio conformacional del gangliósido GD1a

La cadena oligosacárida del GD1a, $NeuAc^{(e)}(2\text{-}3)Gal^{(d)}(1\text{-}3)GalNac^{(c)}(1\text{-}4)[NeuAc^{(f)}(2\text{-}3)]Gal^{(b)}(1\text{-}4)Gal^{(a)}$ (figura 2), fue estudiada con el programa MMP2(85) modificado. La metodología utilizada para la modelación se basa en la aproximación de interacciones independientes entre residuos vecinos (Brant y Christ, 1990), que considera que en la geometría de un enlace glicosídico sólo influyen los residuos adyacentes. La definición de los ángulos torsionales del enlace glicosídico es la clásica: para los azúcares neutros ϕ/ψ son definidos por H-1-C-1-O-1-C'-x y



$$NeuAc^{e}(\alpha 2\text{-}3)\ Gal^{d}(\beta 1\text{-}3)\ GalNAc^{c}(\beta 1\text{-}4)\ [\ NeuAc^{f}(\alpha 2\text{-}3)\ ]\ Gal^{b}(\beta 1\text{-}4)\ Glc^{a}\beta$$

Fig. 2: Estructura del oligosacárido GD1a. Los residuos fueron denotados con letras desde la "a" hasta la "f" comenzando por el extremo reductor.

C-1-O-1-C'-x-H'-x respectivamente. Para los ácidos siálicos estos ángulos son definidos por C-1-C-2-O-2-C'-3 y C-2-O-2-C'-3-H'-3.

La modelación de las subunidades disacáridas se hizo de la siguiente forma: para cada subunidad se realizó un estudio rígido por todo el espacio conformacional ϕ/ψ (desde-180 hasta 180 grados), con un paso de 10 grados. Posteriormente fueron seleccionadas en estos mapas las zonas de menor energía, las cuales fueron investigadas con optimización completa de la geometría con un paso de 5 grados por ambos ángulos.

La aproximación de interacciones independientes es generalmente aceptada como válida para oligosacáridos lineales, sin ramificaciones laterales. El GD1a tiene una ramificación lateral: el ácido siálico (*f*) unido a la galactosa (*b*), por lo que la modelación de la subunidad trisacárida GalNAc(β1-4) [NeuAc(α2-3)] Galβ requiere un análisis especial, siendo en particular interesante el estudio de la flexibilidad del enlace glicosídico del ácido siálico interno.

Utilizamos para este análisis la nueva opción del MM2, realizando un estudio rígido multidimensional por los cuatro ángulos torsionales que definen los enlaces glicosídicos entre las unidades *c-b* y *f-b*. De esa forma es considerada la interacción entre los tres residuos a la vez. Con los resultados de estos cálculos fue construído un mapa "adiabático" para el disacárido *f-b*, o sea, para cada combinación $(\phi,/\psi)_{f\text{-}b}$ se tomó la combinación$(\phi,/\psi)_{c\text{-}b}$ que correspondía a la conformación de más baja energía. A partir de este mapa rígido se seleccionaron las zonas de baja energía, para las cuales fueron calculados mapas flexibles.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se muestran los valores de los ángulos (ϕ/ψ)correspondientes a las principales conformaciones de cada subunidad disacárida. Se presentan los mínimos locales de energía obtenidos con el MM2 en un rango de 5 KCal/mol (Erel.< 5) y los valores de estos ángulos calculados por el HSEA (Sabesan *et al.*,1991). Es de señalar que las diferencias en los valores de, ϕ y ψ, que en algunos casos son del orden de 20°, no son sustanciales, pues los mapas de energía obtenidos para cada disacárido muestran una gran flexibilidad con respecto a las torsiones alrededor de estos enlaces, ya que la energía apenas varía en un rango de ese orden o mayor. Como puede observarse en la Tabla 1, las zonas de más baja energía calculadas con el MM2

Tabla 1

Valores de los ángulos , y 0 en las conformaciones de mínima energía. Mínimos obtenidos con el MM2 en un rango de 5 KCal/mol (Erel 5) en este trabajo y con el HSEA (Sabesan *et al*,

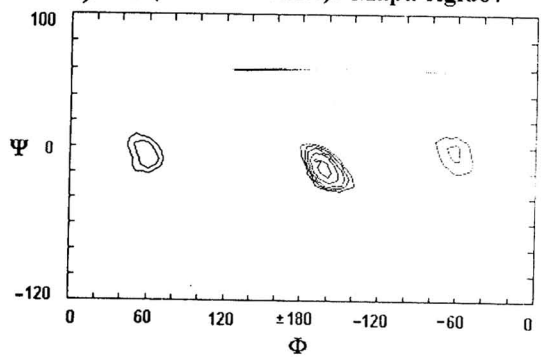
DISCARIDO	MM2			HSEA	
	Φ	ψ	Erel.	Φ	ψ
b-a	29 44 60	-60 6 -159	0 2.5 2.7	55	2
c-b	34	28	0	45	3
d-c	49 171	-24 -6	0 5.0	50	17
e-d= f-b	-170 64 -59	-15 -11 -11	0 3.7 4.1	-163 -80	-12 10

coinciden con las zonas obtenidas por el HSEA para la conformación de mínima energía del GD1a, excepto en el caso del disacárido Gal(1-4)Glc (*b-a)*, donde los valores dados por el HSEA se encuentran en la segunda zona determinada con el MM2.

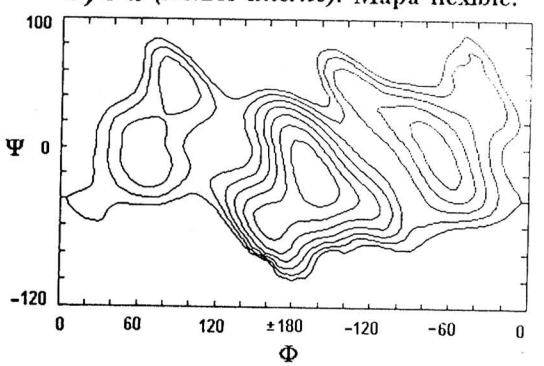
En la figura 3 se muestran tres mapas de energía calculados para el disacárido NeuAc(2-3) Gal. Las líneas isoenergéticas fueron trazadas a intervalos de 1 KCal/mol a partir del mínimo global. El primer mapa (a) corresponde a un estudio rígido, y coincide en gran medida con el mapa reportado por Sabesan *et al.* para este disacárido en la posición terminal de la molécula. El segundo mapa (b) corresponde a un estudio flexible de este disacárido, válido también para la posición terminal en la molécula. Como puede observarse, las zonas de bajas energías son más amplias que en el mapa rígido, debido a que se permite una optimización total de la geometría de la molécula (French *et al.*, 1990.). El mapa muestra que este enlace posee una gran flexibilidad, es decir, la región de los puntos ϕ/ψ a los cuales corresponden energías de hasta 5 KCal/mol sobre el mínimo global es bastante amplia. Esto indica que existe cierta movilidad del enlace glicosídico alrededor de los valores calculados para la conformación de mínima energía. Además, las barreras energéticas entre las distintas zonas son relativamente bajas, del orden de 6-7 KCal/mol, a diferencia de los resultados obtenidos con el HSEA, que dan barreras del orden de 13 KCal/mol.

El tercer mapa (c) corresponde al estudio flexible del enlace entre el ácido siálico interno y la galactosa, incluyendo la interacción con la N-acetil galactosamina, espacialmente próxima al ácido siálico. El estudio rígido multidimensional que sirvió de partida para el análisis flexible mostró que los ángulos torsionales del enlace glicosídico entre la galactosa y la galactosamina se mantienen en la zona de mínima energía encontrada para este disacárido. En el mapa (c) se observa que los mínimos energéticos coinciden con los hallados para el ácido siálico terminal, pero la *geografía* de las zonas varía. A diferencia de la rigidez encontrada por Sabesan *et al.*, nuestros cálculos muestran que se conserva cierta flexibilidad en el enlace (*f-b*). Este resultado no contradice los datos experimentales de RMN reportados por estos mismos autores. Como se observa en el mapa, el rango de variación del ángulo ψ para la conformación preferencial se reduce, pero en cambio se amplia la zona permitida para el ángulo ϕ

a) e-d (NeuAc externo). Mapa rígido.



b) e-d (NeuAc externo). Mapa flexible.



c) f-b (NeuAc interno). Mapa flexible.

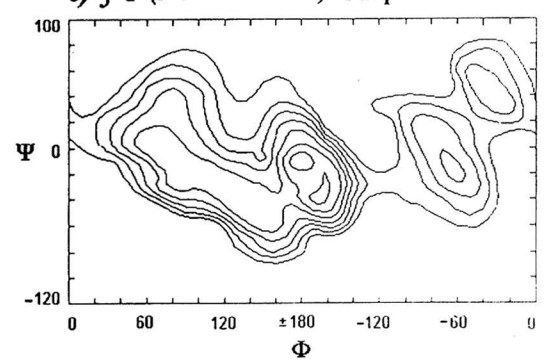


Fig. 3. Mapas de energía del disacárido NeuAc(2-3) Gal en función de los ángulos torsionales , y 0 del enlace glicosídico. a) Mapa rígido para el disacárido terminal. b) Mapa flexible para este disacárido. c) Mapa flexible para el disacárido interno donde se incluye la interacción con la galactosamina.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio conformacional del GD1a utilizando el MM2 concuerdan con los resultados obtenidos con el HSEA y con los datos de RMN reportados recientemente por Sabesan *et al.* Los análisis conformacionales con optimización completa de la geometría permiten estudiar de una manera más completa que con el método de esferas rígidas las conformaciones de mínima energía del oligosacárido, definidas por los ángulos torsionales ϕ/ψ de los enlaces glicosídicos. En efecto, los mapas flexibles de energía permiten evaluar de forma más realista la movilidad del enlace y las barreras energéticas entre las distintas conformaciones posibles.

Los cálculos realizados tomando como base la aproximación de interacciones independientes fueron capaces de predecir correctamente las conformaciones de mínima energía del oligosacárido en total, incluso para el ácido siálico interno, pero no predijeron de forma correcta la movilidad de este enlace. La modificación realizada al MM2 nos permitió estudiar de forma más rigurosa este problema, y permitió además un ahorro considerable de tiempo de cálculo en los estudios conformacionales realizados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al profesor Luis A. Montero de la Facultad de Química de la U.H. por facilitarnos los códigos fuentes del programa MMP2(85), y por habernos iniciado en la *química computacional.*

REFERENCIAS

ALLINGER, N.L.(1977). *J. Am. Chem. Soc.* **18**:2993.

BRANT, D.A. and M.D. CHRIST. (1990). Computer Modeling of Carbohydrate Molecules (Chapter 4); Ed. Alfred D. French; *Am. Chem. Soc.*

CLARK, T. (1985). *A Handbook of Computational Chemistry*; John Wiley and Sons; New York.

FRENCH, A.D.; V.H. TRAN and S. PEREZ, (1990). Computer Modeling of Carbohydrate Molecules (Chapter 12); Ed. Alfred D. French; *Am. Chem. Soc.*

LEMIEUX, R.U.; K. BOCK, L.T.J. DELBAERE, S. KOTO and V.S. RAO. (1980). *Can. J. Chem.* **58**:631.

NORSKOV-LAURITZEN, L.; N.L. ALLINGER. (1984). *J. Computational Chem.* 326.

SABESAN, S.; J. DUUS; T. FUFUNAGA, K. BOCK, S. LUDVIGSEN. (1991). *J. Am. Chem Soc.* **113**:3236.

THOGERSEN, H.; R.U. LEMIEUX; K. BOCK, B. MEYER. (1982). *Can. J. Chem.* **60**: 44.

WIEGANDT, H. (1985). In: *Glycolipids; New Comprehensive Biochemistry*, Ed. Wiegandt, H., Elsevier, New York. **10**:199

MMP2(85) Users Manual. (1987). Quantum Chemistry Program Exchange, Bloomington, Indiana.