

# DETERMINACION DEL SUBEPITOPE DE INTERACCION DE GANGLIOSIDOS MONOSIALILADOS POR UN ANTICUERPO MONOCLONAL.

Cruz, R.\*; Fernández, L.E.\*\*; Garrido, J.D.\*; Moreno, E.\*\*; Pérez, R.\*\*; Rojas, G.\*; Vázquez, A.M.\*\*

\*Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Nucleares

\*\*Centro de Inmunología Molecular

## RESUMEN

Utilizando programas de Mecánica Molecular y Cuánticos Semiempíricos se determinaron las características conformacionales y electrónicas de la parte oligosacáridica de los gangliósidos GM3, GM2 y GM1 así como de sus análogos que contienen el residuo NeuGc (Gc=Glicolyl, CH<sub>2</sub>OHCO) con el fin de explicar el comportamiento del anticuerpo P3 en el reconocimiento de estos gangliósidos. Este anticuerpo reconoce las variantes NeuGc del GM2 y el GM3 pero no lo hace con sus variantes N-acetiladas. No se encontraron diferencias conformacionales apreciables entre los análogos NeuAc y NeuGc pero se encontró una diferente distribución del potencial electrostático en la función nitrogenada del ácido siálico para cada análogo. Estos resultados nos permiten afirmar que la región de interacción del complejo gangliósido-anticuerpo, definido por nosotros como "subepitope de interacción", es más pequeña que la tradicionalmente aceptada como zona de epitope y puede ser definida utilizando el potencial electrostático.

## ABSTRACT

The conformational and electronic features of the oligosaccharide part of GM3, GM2 and GM1 gangliosides, and its analogs containing the NeuGc residue (Gc = Glicolyl, CH<sub>2</sub>OHCO) have been determined using a combination of Molecular Mechanics and Quantum Semiempirical techniques, in order to explain the behavior of the P3 antibody in the recognition of these gangliosides. This antibody recognizes the NeuGc variant of GM2 and GM3 gangliosides but did not their NeuAc analog. No remarkable conformational differences between NeuAc and NeuGc analogs were noticed, while a different while a different electrostatic potential distribution in the neighborhood of the N-function of sialic acid residues of each analog was found. These results allow us to affirm that interaction region of the complex ganglioside-antibody, namely "interaction subepitope", smaller than traditionally accepted idea of "epitope" and it is defined using electrostatic potential.

## INTRODUCCION

En la literatura reciente han estado apareciendo trabajos relacionados con estudios acerca del comportamiento inmunogénico de variantes químicas de los gangliósidos naturales. Por ejemplo en [1] se estudia el GM3 lactonizado, en [2] el NeuGcGM3 y el 4-0 acetyl NeuGcGM3 y en [3-7] modificaciones del GD3, GM1 y GD2.

Este esfuerzo está dirigido a la obtención, con estas variantes químicas, de una respuesta

inmune efectiva con anticuerpos capaces de reconocer a los gangliósidos naturales con lo que se lograría evitar la tolerancia provocada por el hecho de que los gangliósidos naturales son reconocidos como elementos propios por el sistema inmune.

En un trabajo anterior nuestro grupo realizó el estudio de las conformaciones espaciales de mínima energía de las variantes químicas NeuAcGM3, NeuGcGM3 y de NeuAcGM3 [8], con el fin de encontrar características estructurales

que pudieran relacionarse con la inmunogenicidad de esas variantes. En el presente trabajo se reporta el comportamiento de un anticuerpo monoclonal (AcM) ante una batería de gangliósidos monosialilados (GM1, GM2 y GM3) y se realiza el estudio de sus estructuras espaciales, con el fin de explicar ese comportamiento y determinar la zona por donde se produce el "anclaje" (subepitope de interacción) a partir de criterios estructurales y electrostáticos.

## DESARROLLO

En la Tabla 1 aparecen los resultados experimentales obtenidos al estudiar el reconocimiento de una batería de gangliósidos por un AcM mediante ELISA. Como se ve en la Tabla, el anticuerpo reconoce sólo las variantes glycoloyladas utilizadas en el experimento, por lo que puede pensarse que existen diferencias en la estructura espacial de estas variantes químicas que pudieran explicar estos resultados.

se volvió a minimizar con el programa HAVPAC, de carácter semiempírico, que permite la obtención de mejores resultados en la minimización, incluye la existencia de puentes de hidrógeno y calcula parámetros electrostáticos de interés, como la carga efectiva y densidad electrónica por átomos. Los cálculos fueron realizados en una PC 486 Intel DX/2 50 MHz.

Las configuraciones de mínima energía obtenidas por los dos métodos no difieren entre sí, en lo que se refiere a los ángulos de los enlaces glicosídicos, y en el caso del GM3 el resultado coincide con el reportado en [10], donde se realizaron estudios teóricos y experimentales de las variantes acetyladadas y glycoloyladas del GM3.

En la Figura 1 se muestran los diagramas de las estructuras de las variantes acetylada y glycoloylada del GM3. Como puede verse para este gangliósido la estructura espacial de la variante glycoloylada es prácticamente igual a la correspondiente de la variante acetylada. Lo mismo ocurre para el GM2 [8] y para el GM1. En todos los casos la función nitrogenada

**Tabla 1: Resultados experimentales con ELISA del reconocimiento del AcM con una familia de gangliósidos monosialilados.**

	GM1	GM2	GM3	NeuGcGM2	NeuGcGM3
AcM	—	—	—	++++	++++

\* Todos los valores se reportan en unidades atómicas

Ya que en el experimento fueron reconocidas sólo las variantes químicas glycoloyladas del GM2 y del GM3, se realizó el estudio comparativo de las variantes acetyladadas y glycoloyladas de los gangliósidos monosialilados GM1, GM2 y GM3 para buscar entre ellas diferencias estructurales que pudieran explicar la diferencia en el comportamiento.

Para realizar este estudio de estructura se utilizó un programa de mecánica molecular, el MMP2 (85) [9], con el que se encontraron las conformaciones más probables de mínima energía de las variantes químicas de los tres gangliósidos, y utilizando estas configuraciones de mínima energía como estructuras de partida,

aparece expuesta, es decir, es completamente accesible, y la única diferencia apreciable es la existencia del grupo hidroxilo en la variante N-glycoloylada, que se encuentra bien expuesto.

Ya que el criterio de estructura espacial no puede explicar el comportamiento del anticuerpo, y considerando que la existencia del hidroxilo en la variante glycoloylada debe producir cambios en las características electrostáticas de los gangliósidos se estudió la distribución de la carga efectiva y de la densidad electrónica por los átomos, así como el potencial electrostático generado por la carga efectiva, como parámetros que permitan explicar el fenómeno.

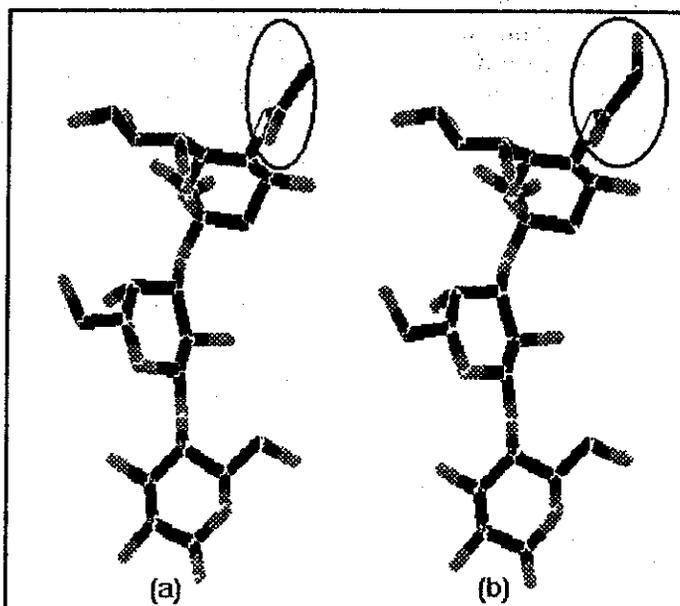


Figura 1:Variantes N-acetylada (a) y N-glycolada (b) del GM3. En la misma se encuentra indicada la función nitrogenada de estas moléculas.

Atomo	NeuAc						NeuGc					
	GM3		GM2		GM1		GM3		GM2		GM1	
	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
C(O)	.316	3.684	.317	3.683	.317	3.683	.283	3.717	.282	3.718	.282	3.718
C	-.256	4.256	-.256	4.256	-.256	4.256	-.054	4.054	-.054	4.054	-.055	4.054
H	.100	0.899	0.100	0.899	.100	0.900	.208	.792	.207	.792	.207	.792

Tabla 2: Valores de las cargas efectivas(C) y de las densidades electrónicas(D) de algunos átomos pertenecientes a la función nitrogenada de los gangliósidos GM1, GM2 y GM3 en sus variantes N-acetylada y N-glycolada. Todos los valores se reportan en unidades atómicas.

En la Tabla 2 se reportan los átomos para los cuales hay desigualdades en las cargas efectivas y densidades electrónicas por átomos. Se ve claramente, que dentro de una misma variedad química no hay diferencias para estos parámetros señalados entre los gangliósidos, pero éstas sí existen entre las variantes glycoloylada y acetylada. Estas diferencias en las cargas deben provocar variaciones en el potencial electrostático en las inmediaciones de las moléculas. Esto

puede verse con claridad en los gráficos de curvas equipotenciales representadas en las Figuras 2 - 4.

Para la realización de estos gráficos la molécula fue orientada de manera que el origen de coordenadas coincidiera con el átomo de nitrógeno, el átomo de carbono del grupo CH<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>OH) estuviera sobre el eje Z, en su lado positivo, y el carbono enlazado con el nitrógeno y

el oxígeno en el plano (Y,Z). Cada 10 divisiones de los ejes representa 1Å°. De una curva equipotencial a la siguiente hay un cambio de dos unidades en el potencial. La región donde se encuentran las variaciones se localiza en  $-10 < X < 20$ ;  $-10 < Y < 20$ ;  $10 < Z < 30$  y allí quedan también ubicados los átomos de los residuos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2\text{OH}$ .

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Como puede verse en la Figura 2, las curvas equipotenciales para el plano  $Z=3\text{Å}^\circ$  son prácticamente iguales dentro de una misma variedad química para todos los gangliósidos, pero cambian de una variedad química a la otra. Una situación similar se observa en las Figuras 3 y 4 que corresponden al plano  $X=1\text{Å}^\circ$  para las variantes químicas del GM3 y el GM1, dentro de la zona que se indicó más arriba, e igualmente en los gráficos que se obtienen para el plano  $Y=2\text{Å}^\circ$  de cada gangliósido y para el plano  $X=1\text{Å}^\circ$  del GM2 (no se muestran).

Las desigualdades observadas son, en esencia, regiones de potencial negativo que aparecen producto de la existencia del oxígeno adicional que tiene el residuo glycoloyl. Un análisis más detallado de estos gráficos será realizado en un trabajo posterior.

Todo lo anteriormente apuntado indica, que cuando el anticuerpo "mira" a las moléculas GM2 y GM3 desde el lado en que aparece en primer término la función nitrogenada, no puede diferenciar a las variantes químicas por sus estructuras espaciales pero sí "reconoce", en todos los casos, a las variantes N-glycoloyladas mediante sus características electrostáticas propias.

Sobre la base del criterio de que la interacción del anticuerpo con el gangliósido es de carácter esencialmente electrostático puede inferirse que la región del anticuerpo que reconoce al gangliósido se enlaza al mismo usando una zona de pequeña área que debe contener pocos residuos de aminoácidos cuyas características electrostáticas deben ser complementarias a las aquí mostradas.

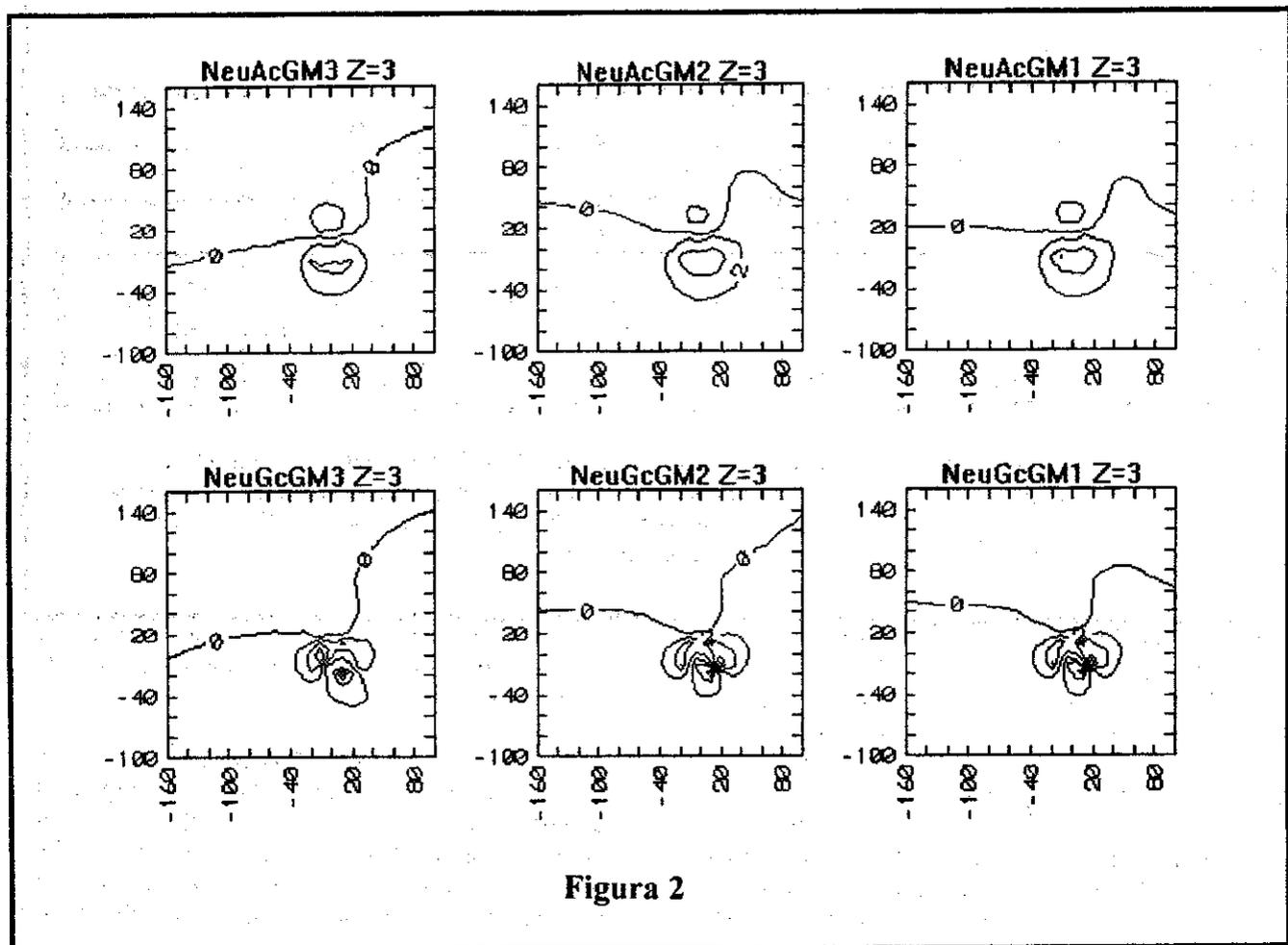
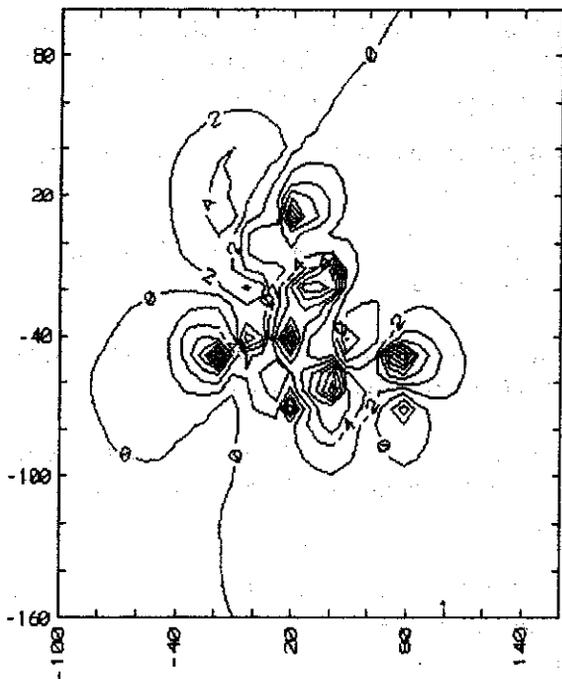


Figura 2

NeuAc GM3 X=1



NeuGc GM3 X=1

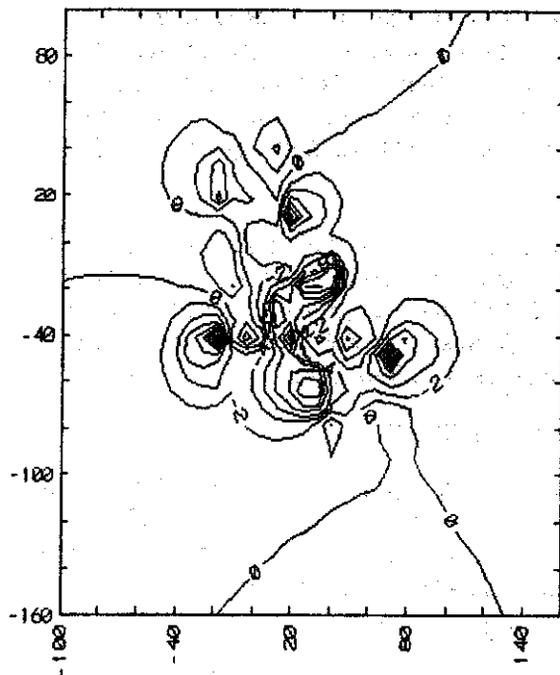
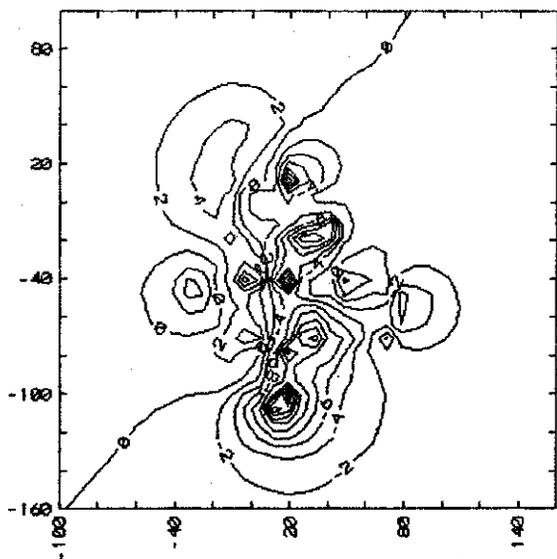


Figura 3

NeuAc GM1 X=1



NeuGc GM1 X=1

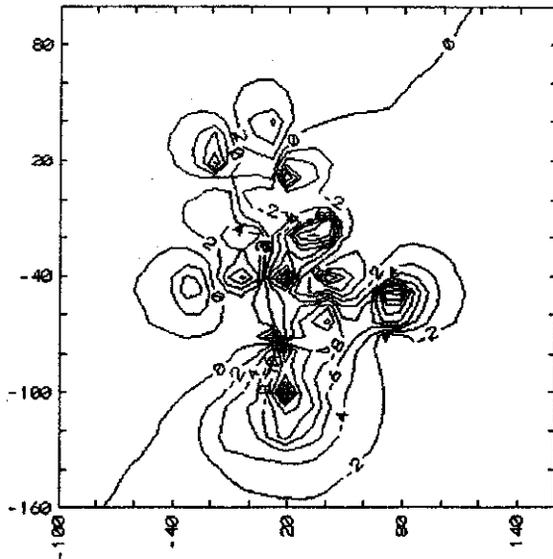


Figura 4

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten afirmar que hemos localizado una región de enlace mucho más pequeña que la que tradicionalmente en la literatura aparece bajo el concepto de epitope. A esta zona le hemos llamado subepitope de interacción y queda perfectamente definida a partir del potencial electrostático que se crea en la región.

Los gráficos de potencial mostrados permiten predecir que el AcM debe reconocer al NeuGcGM1 ya que sus gráficos coinciden con los correspondientes del GM2 y el GM3 en la región del subepitope de interacción.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos aprovechar la oportunidad para agradecer la ayuda brindada al profesor Luis Montero de la Facultad de Química de la U.H. que ha hecho posible la realización de ese trabajo.

## REFERENCIAS

Nores G., Dohi T., Taniguchi M. and Hakomori S. I. *J. Immunol.* 139, (1987), 3171.

Dohi T., Nores G. and Hakomori S. I. *Cancer Res.* 48, (1988) 5680.

Dohi T., Nores G. A., Oguchi H., Inufusa H. and Hakomori S. *Gangliosides and Cancer*, Chapt. 27, (1989) pp 275.

Ritter G., Boosfeld E., Markstein E., Yu R., Ren S., Stallcup W. B., Oettgen H. F., Old L. J. and Livingstone P. O. *Cancer res.* 50, (1990), 403.

Nakamura K. and Handa S.. *J. Biochem.* 99, (1986), 219.

Handa S. and Nakamura K.. *J. Biochem.* 92, (1984), 1323.

Tai T., Kawashima I., Tada N. and Ikegami S. *Biochem. Biophys. Acta.* 134, (1988), 958.

Moreno E., Cruz R., Pérez N. C. y González N. *Revista Cubana de Biotecnología Aplicada.* (In press).

MMP2(85). User Manual. *Quantum Chemistry Program Exchange*, Bloomington, Indiana (1989) p 12.

Hans-Christian Siebert, Gerd Reuter, Roland Schauer, Claus-Wilhelm von der Lieth, and Janusz Dabrowski. *Biochemistry.* 31, (1992), 6962-6971.