

# Uso de la biología computacional para comparar las estructuras terciarias teóricas de las formas más comunes de RHCE y RHD

Estrada Juárez Higinio\*

La biología computacional combina conocimientos fisicoquímicos, bioquímicos y de biología molecular con la mecánica cuántica; nos permite comprender las variaciones en el microambiente molecular y cómo pequeños cambios químicos en el pH, la temperatura o la molaridad pueden afectar las interacciones de las proteínas. Sin embargo, predecir las estructuras de las proteínas es una tarea extremadamente difícil. Los dos problemas principales son calcular la energía libre y encontrar su mínimo global.

Si existen estructuras similares en la biblioteca PDB, la predicción estructural de proteínas se puede dividir en: modelado basado en plantillas y modelado libre. El éxito del análisis estructural depende de la determinación experimental de la estructura de proteínas óptimamente seleccionadas y algoritmos de modelado informático eficientes.<sup>1</sup>

Conroy y colaboradores propusieron una de las primeras estructuras terciarias RhD.<sup>2</sup> Recientemente, algunos estudios han intentado explicar las variaciones entre las asociaciones dentro del complejo RhAG-RhD-RhCE<sup>3,4</sup> y la identificación de variantes débiles de RhD mediante la sustitución de aminoácidos (AA).<sup>5,6</sup>

El estudio de Cherif-Zahar<sup>7</sup> es uno de los más influyentes sobre la descripción tridimensional de la proteína RhD. Los estudios que lo utilizan para explicar las variantes D, sustituyen los AA mutantes en la estructura secundaria. El esquema de Wagner y Flegel<sup>8</sup> trata de explicar las posiciones de los 35 AA que difieren RhCE y RhD a partir de la estructura secundaria de una sola proteína. Desde entonces, se ha arraigado en la medicina transfusional la idea de que los cambios transmembrana no afectan las asas exofaciales o que los cambios deberían involucrar a más de un AA. Sin embargo, este concepto no considera la estructura terciaria, ni la interacción con la membrana (espesor hidrofóbico)<sup>3,5</sup> y tampoco que el resultado de cualquier sustitución de AA afecta las propiedades fisicoquímicas y la funcionalidad de la proteína,<sup>9</sup> por ejemplo, el perfil de solubilidad de la proteína, hasta el punto de que se altera el reconocimiento por parte de los anticuerpos. Los alelos RHCE\*ceRT<sup>10</sup> y RHCE\*ceSL02<sup>11</sup> son ejemplos de cómo el cambio de un AA (p.Arg154Thr y p.Ser122Leu, respectivamente) expone epítomos RhD que normalmente carecen.

\* Coordinación de Hematología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología «Isidro Espinosa de los Reyes», Ciudad de México.

**Citar como:** Estrada JH. Uso de la biología computacional para comparar las estructuras terciarias teóricas de las formas más comunes de RHCE y RHD. Rev Mex Med Transfus. 2024; 16 (s1): s10-s13. <https://dx.doi.org/10.35366/117579>

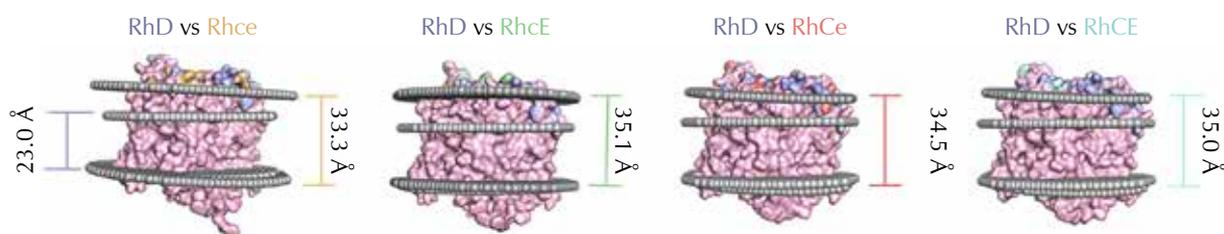


En nuestro trabajo,<sup>12</sup> el objetivo fue identificar las diferencias estructurales teóricas entre las cuatro formas de RhCE y RhD utilizando herramientas biológicas computacionales. Para ello, calculamos los efectos de las sustituciones de AA en la conformación final de las proteínas Rh, determinando el perfil fisicoquímico de cada proteína según el análisis de hidrofobicidad, potencial electrostático (PE), estructura secundaria y comparación de estructuras terciarias. Luego, creamos modelos 3D de RhD y RhCE para comparar las regiones de proteínas que pueden explicar las diferencias antigénicas. Usamos el modelado por homología que compara modelos estructurales, que está directamente asociado con la accesibilidad de plantillas de proteínas relacionadas. Antes que nosotros, Floch y colaboradores<sup>3</sup> utilizaron modelos comparativos para obtener información estructural 3D sobre variantes de RhD asociadas con la formación de anti-D. Sin embargo, mapearon las posiciones de las diferentes variantes en el mismo modelo estructural. Recientemente, publicaron un trabajo en el que toman como referencia nuestro modelo.<sup>13</sup>

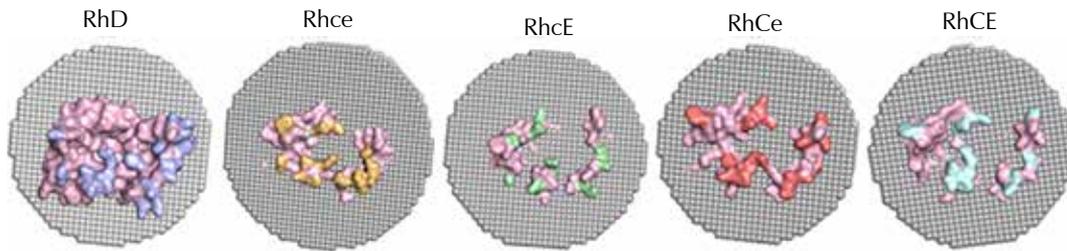
Aunque las secuencias de las proteínas Rh son similares en un  $91.71 \pm 0.31\%$ , se distribuyen de manera diferente en la membrana debido a la hidrofobicidad de sus AA, de modo que el espesor hidrofóbico de RhCE es mayor que el de RhD, lo que facilita la interacción con la RhAG. La unión entre RhD y RhAG sería menos estable espacialmente porque dos de los AA estarían fuera de la membrana en el caso de RhD. Vallese et al describieron que el dominio de unión entre la membrana y anquirina-1 tiene tres elementos constitutivos diferentes: transmembrana (RhCE y AQP1), extra membrana (dominios de la banda citosólica 3) y adaptadores

periféricos (proteína 4.2).<sup>14</sup> Explican que el heterotrímero Rh es el ancla entre el citoesqueleto y la membrana a través de la interacción entre los extremos N y C de RhCE y las primeras cinco repeticiones de anquirina-1.<sup>15</sup> Curiosamente, Vallese et al,<sup>14</sup> no detectaron RhD dentro de la estructura del heterotrímero Rh, aunque utilizaron sangre RhD positiva. Sólo observaron complejos multiproteicos con RhCE, y explicaron que podía deberse a la diversidad del complejo RhAG-Rh o que RhD no está asociado con el complejo de anquirina de la banda 3 y, alternativamente, está asociado con el complejo de unión 4.1R como en los ratones. Nuestros resultados sugieren que la región hidrofóbica de RHAG mide  $34.2 \text{ \AA}$ , es muy similar a la de las cuatro formas de RhCE, que promedian  $33,83 \text{ \AA}$ . Desde un punto de vista estequiométrico, la región hidrofóbica de RhD es  $11 \text{ \AA}$  más estrecha (*Figura 1*); esto explica que sus bucles exofaciales sean 3.89 veces más largos que los de las isoformas RhCE, y el acoplamiento con RhAG sería inestable. Varias proteínas forman el macrocomplejo de la membrana de los eritrocitos, cuya estructura cuaternaria resulta de sus interacciones. Las regiones citoplasmáticas y transmembrana de las proteínas analizadas están conservadas, posiblemente debido a interacciones con RhAG y anquirina. Los giros exofaciales  $\beta$  y  $\gamma$  son las únicas regiones «libres» definidas por interacciones, siendo el microambiente la región más variable de las cinco formas. En la práctica, estas diferencias están efectivamente presentes porque los anticuerpos anti-RhD no reconocen las formas RhCE, y existen diferencias entre estas últimas que las hacen especiales (*Figura 2*).

Es cierto que las estructuras obtenidas experimentalmente son más precisas. Sin embargo, hay



**Figura 1:** Vista lateral de la superposición estructural de Rhce, RhcE, RhCe y RhCE (claro) en RhD (oscuro), a un costado de cada imagen se indican los valores del grosor hidrofóbico (Å). En el binomio RhD versus RhCE se muestra el desplazamiento de  $22^\circ$  del eje de RhCE (líneas punteadas) con respecto al de RhD (línea continua).



**Figura 2:** Vista superior de las proteínas RhD (gris oscuro) y las cuatro formas de RhCE (blanco). En negro se destacan los epítopes de cada proteína.

que tener en cuenta que se obtuvieron en condiciones muy controladas, incluso «artificiales», y la estructura es producto de esas zonas «estresadas». Aunque los datos de los modelos computacionales pueden no ser tan precisos, teóricamente es posible controlar estos cambios. Comparando nuestros modelos de RhCE con el macrocomplejo del modelo de Vallese, se ajustaron a la estructura RhCE, mientras que RhD se ajustó a RhAG, indicando que son proteínas diferentes, confirmando los modelos obtenidos por biología computacional.

Las estructuras de RhD y RhCE son diferentes. Los valores de PE son específicos para cada proteína, lo que significa que se organiza de manera diferente en el mismo disolvente. Eran de esperar diferencias conformacionales de los bucles en longitud y secuencia. Sin embargo, también pueden ser consecuencia de la flexibilidad conformacional del polipéptido completamente plegado.

Las diferencias entre RhD y RhCE se explican tradicionalmente por cambios en cinco AA en las posiciones 15, 59, 67, 102 y 225 (Esta numeración resulta de la remoción de la metionina inicial).<sup>7</sup> Destacan dos cambios, el primero en 102 porque es exofacial y distingue C/c. El segundo es 225 porque es el único cambio en E/e. Sin embargo, nuestros datos sugieren que estas sustituciones son en la región transmembrana, pero tienen un efecto sobre la conformación exofacial. Así, cuando se analizan microdominios y estructuras secundarias, la diferencia entre C y c está en L1 (Ser36-Leu37) y L2 (Pro101). La diferencia entre los antígenos E y e está en L6 (Val351-Met357). El Rhce es el único con la diferencia L4 (Arg228-Pro230).

Se ha sugerido que el antígeno G está expuesto en RhD, RhCe y RhCE, lo cual es causado por la variación p.Ser102Pro. Nuestros resultados sugieren

que el cambio estructural no se debe a la variante, sino que es consecuencia de la interacción con otros AA, no solo con los AA laterales en la estructura primaria sino también a través de interacciones fisicoquímicas con otros en la estructura terciaria, más aún con AA de otras proteínas del complejo (estructura cuaternaria). Sugerimos que este cambio no sea necesariamente en L2 (Phe100-Ser102), porque los microdominios estructurales y las estructuras secundarias predichas son las mismas en esa región en las cinco proteínas.

En conclusión, aunque son genes homólogos, las proteínas de las cinco formas Rh se diferencian por sus particulares propiedades fisicoquímicas. Creemos que explicar las diferencias en estas proteínas reemplazando selectivamente el modelo propuesto por Wagner y Flegel no es correcto porque no permite demostrar las diferencias estructurales entre las variantes Rh.

Utilizando la biología computacional podemos modelar estructuras suficientemente precisas y similares a las obtenidas experimentalmente, lo que nos permite asumir las diferencias «topológicas» que reconoce un anticuerpo. Los fenotipos G+, RHCE\*ceRT+ y RHCE\*ceSL.02+, entre otros, prueban que la variación en la secuencia AA (estructura primaria) altera conformacionalmente la estructura terciaria. Además, las interacciones con las otras proteínas modifican el ambiente electrostático, cambiando las conformaciones espaciales (estructura cuaternaria) y por tanto el reconocimiento antigénico.

## Referencias

1. Zhang Y. Progress and challenges in protein structure prediction. *Curr Opin Struct Biol.* 2008; 18: 342-348.
2. Conroy MJ, Bullough PA, Merrick M, Avent ND. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol.* 2005; 131: 543-551.

3. Floch A, Pirenne F, Barrault A, Chami B, Toly-Ndour C, Tournamille C et al. Insights into anti-D formation in carriers of RhD variants through studies of 3D intraprotein interactions. *Transfusion*. 2021; 61: 1286-1301.
4. Gruswitz F, Chaudhary S, Ho JD, Schlessinger A, Pezeshki B, Ho CM, et al. Function of human Rh based on structure of RhCG at 2.1 Å. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 9638-9643.
5. Zhang X, Li G, Zhou Z, Shao C, Huang X, Li L et al. Molecular and computational analysis of 45 samples with a serologic weak D phenotype detected among 132,479 blood donors in northeast China. *J Transl Med*. 2019; 17: 393.
6. Trueba-Gomez R, Rosenfeld-Mann F, Estrada-Juarez H. Prediction of the antigenic regions in eight RhD variants identified by computational biology. *Vox Sang*. 2024; 119: 590-597.
7. Cherif-Zahar B, Bloy C, Le Van-Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P et al. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 6243-6247.
8. Wagner FF, Cassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1999; 93: 385-393.
9. Meireles MR, Stelmach LH, Bandinelli E, Vieira GF. Unveiling the influence of factor VIII physicochemical properties on hemophilia A phenotype through an in silico methodology. *Comput Methods Programs Biomed*. 2022; 219: 106768.
10. Wagner FF, Ladewig B, Flegel WA. The RHCE allele ceRT: D epitope 6 expression does not require D-specific amino acids. *Transfusion*. 2003; 43: 1248-1254.
11. Chen Q, Hustinx H, Flegel WA. The RHCE allele ceSL: the second example for D antigen expression without D-specific amino acids. *Transfusion*. 2006; 46: 766-772.
12. Trueba-Gomez R, Rosenfeld-Mann F, Baptista-Gonzalez HA, Dominguez-Lopez ML, Estrada-Juarez H. Use of computational biology to compare the theoretical tertiary structures of the most common forms of RhCE and RhD. *Vox Sang*. 2023; 118: 881-890.
13. Floch A, Galochkina T, Pirenne F, Tournamille C, de Brevern AG. Molecular dynamics of the human RhD and RhAG blood group proteins. *Front Chem*. 2024; 12: 1360392.
14. Vallese F, Kim K, Yen LY, Johnston JD, Noble AJ, Cali T et al. Architecture of the human erythrocyte ankyrin-1 complex. *Nat Struct Mol Biol*. 2022; 29: 706-718.
15. Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, Birkenmeier C, Cartron JP, Colin Y et al. Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem*. 2003; 278: 25526-25533.