



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización Tisular y Subcelular del
Transportador SLC16A11

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Andrea Celeste Medina Garcia

TUTORA PRINCIPAL

Dra. María Teresa Tusié Luna
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
[Instituto de Neurobiología](#)
Dr. Diego González Halphen
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Agosto, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Agradecimientos académicos

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Teresa Tusié Luna en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"(INCMNSZ), sede externa del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

Durante la realización del proyecto, se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los proyectos 138826 y 128877; así como también de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, IT 214711.

Agradezco también al CONACyT por la beca otorgada durante la realización de los estudios de maestría con número de registro 619941 y al programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir al XXXII Congreso Nacional de Bioquímica.

Se reconoce y agradece al comité tutorial que asesoró el desarrollo de este proyecto y que estuvo conformado por la Dra. María Teresa Tusié Luna (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), el Dr. Diego González Halphen (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y el Dr. Mauricio Díaz Muñoz (Instituto de

Neurobiología, UNAM).

De igual manera, se agradece la revisión, sugerencias y observaciones realizadas a este trabajo por parte del jurado de examen conformado por:

- Presidente: Dra. Nimbe Torres y Torres, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".
- Vocal: Dr. Álvaro Marín Hernández, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez.
- Vocal: Dra. Sara Luz Morales Lázaro, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Vocal: Dra. María Soledad Funes Argüello, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Secretario: Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Este trabajo se desarrolló con el amplio, constante e invaluable apoyo técnico del M. en C. José Luis Ventura Gallegos de la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ/UNAM. También agradezco al Dr. Saúl Cano Colín de la Unidad de Biología Molecular del INCMNSZ/UNAM por su apoyo técnico.

La localización de la proteína de interés mediante microscopía electrónica fue posible gracias al trabajo constante que se realizó en colaboración con el Biól. Juan Carlos León Contreras del Departamento de Patología del INCMNSZ.

Los experimentos de inmunohistoquímica se realizaron gracias al invaluable apoyo experimental de la Dra. Janette Furuzawa Carballeda del Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ.

Agradezco la asesoría y guía en la realización de la 2D SDS-PAGE y espectrometría de masas del Dr. Jorge Herrera Díaz de la USAII, Facultad de Química (UNAM).

Agradezco al Dr. Alejandro Zentella por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar experimentos así como hacer uso del material y equipo.

La investigación fue enriquecida por los investigadores: Dr. Víctor M. Ortiz, Dr. Álvaro Marín Hernández y Dra. Paola de los Heros.

También agradezco la colaboración de la Dra. Diana Aguilar León y de la Dra. Norma Ofelia Uribe Uribe del departamento de Patología del INCMNSZ por facilitarnos la obtención de muestras humanas.

Agradecimientos personales

A mis manas de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del INCMNSZ: Julia, Dany Mariel y Ale. Gracias por su amistad, compañía y apoyo durante la realización de este proyecto. Sin duda alguna, *El Club Nocturno* hizo que fueran más llevaderas las largas jornadas de trabajo, las quiero.

A los ositos saludables del Departamento de Bioquímica del INCMNSZ: Albertico, Ernesto (a.k.a. osito), Andrei y Betty. Mil gracias por los jueves de amistad, por auxiliarme en tierras desconocidas y por hacer que Bioquímica fuera mi segunda guarida.

A Gaby Morales. Eres una amiga increíble, te agradezco tus consejos y tu apoyo. Te quiero mucho.

A Saúl Cano. Muchas gracias por brindarme tu amistad, por escucharme, por las comidas y salidas al té con pláticas interesantísimas. Eres un gran amigo.

A mi manito Emmanuel Marín (a.k.a. Mishi). Me gustaría agradecerte que siempre me escuchas (incluyendo mi verborrea científica), que me hayas dado palabras de aliento cuando las necesité y por gordear conmigo cada que me sentía pésimo (y también cuando no) porque no me salían los experimentos, eres el mejor.

A Víctor, mi persona especial. Gracias por ser mi casa, por estar ahí siempre para mi, por motivarme a ser una mejor persona en todos los aspectos, de ti aprendí lo lejos que pueden llevarme mis piernas sobre una bici y que no existe ningún obstáculo que no pueda ser superado con esfuerzo y constancia. Te amo siempre.

A Danae, la mejor hermana del mundo. Desde que llegaste a mi vida has sido un solecito que alumbra mi camino, recuerda que me haces sentir muy orgullosa y deseo que, como hasta ahora, cumplas todas las metas que te propongas. Te amo mucho.

A mi mamá, Angeles. Mamita gracias por todo tu amor, por tu apoyo incondicional, por alentarme a seguir adelante y a nunca darme por vencida. Te prometo que voy a esforzarme mucho en ser mejor cada día para que te sientas tan orgullosa de mi como yo lo estoy de ti. Te amo demasiado.

A mi papá falso Paquito. Agradezco mucho el amor que nos tienes, tu infinita paciencia y todo el apoyo que nos das. Gracias por apoyarme en mis locuras, sé que podré contar contigo siempre, tu eres la familia que elegimos tener, te quiero mucho.

A mi abuelito Agustín. Desde que tengo memoria has estado ahí para mi, muchas gracias por cuidarnos siempre, por ser un abuelito amoroso y nunca perder la confianza en mi, te quiero.

A mi panterita Marcy, mi espojoso Gricesito y mi pequeña Rayita. No imagino mi vida sin ustedes, me hacen muy feliz.

Resumen

La Diabetes tipo 2 (DT2) es un desorden metabólico complejo que aunque está influenciado mayormente por factores ambientales asociados con el estilo de vida, tiene un riesgo genético altamente hereditario. La prevalencia de la DT2 en Latinoamérica es alta y es la segunda causa más común de muerte en México. Uno de los mayores loci de riesgo genético para la DT2 se encuentra en el cromosoma 17p13 e incluye cinco variantes codificantes en el gen *SLC16A11*. Este haplotipo de riesgo de la DT2 se presenta con alta frecuencia en la población mexicana y podría explicar el incremento de la prevalencia de la DT2 en nuestro país.

En este estudio se creó un modelo estructural de la proteína MCT11 codificada por el gen *SLC16A11*, el cual fue utilizado para realizar simulaciones de acoplamiento molecular (*molecular docking*) con cinco tipos de ligandos (lactato, piruvato, cuerpos cetónicos, aminoácidos aromáticos y hormonas tiroideas). Nuestros resultados sugieren que MCT11 podría transportar otros monocarboxilatos además del piruvato. También se caracterizó la expresión de MCT11 en muestras de hígado humano y rata, donde se identificaron dos bandas: la primera de 50 kDa correspondiente al monómero de la proteína y la segunda de 25 kDa, posiblemente resultante de algún procesamiento proteolítico post-traduccional. También se identificó que MCT11 está localizado en el retículo endoplásmico, membrana plasmática, mitocondria, núcleo y vacuolas lipídicas de hepatocitos de humano y de rata a través de la tinción de

inmuno-oro coloidal e inmunohistoquímicas. Se analizó además la expresión de MCT11 en cinco tejidos humanos relevantes en la fisiopatología de la DT2 (hígado, páncreas, tiroides, tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo), y se encontró una mayor expresión en el tejido adiposo visceral en comparación con el resto de los tejidos analizados. De manera adicional, se identificó a las células α y β pancreáticas como nuevos sitios de expresión tisular de la proteína MCT11, donde no se había identificado previamente la expresión de ningún otro transportador MCT. Todos los resultados en conjunto, sugieren que MCT11 podría estar desempeñando diferentes papeles en cada tejido analizado transportando diversos ligandos.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is a complex metabolic disorder, that although influenced by environmental factors, it has a highly heritable genetic risk. There is a high prevalence of T2D in Latinoamerica and it is the second cause of death in Mexico. One of the largest genetic risk loci for T2D is located at chromosome 17p13 and includes five coding variants in SLC16A11 gene. This T2D-risk haplotype is present at a high frequency among the Mexican population and it could explain the increasing prevalence in our country. In this study, we built a structural model for the protein MCT11 codified for SLC16A11 gene, and we used this model to test molecular docking of five different types of substrates (i.e. lactate, pyruvate, ketone bodies, aromatic amino acids and thyroid hormones). Our results suggest that MCT11 might be able to bind other molecules besides pyruvate. We characterized the expression of MCT11 in human and rat samples and we found two bands: one of 50 kDa corresponding to a monomer of MCT11 and another one of 25 kDa, possibly resulting from post-translational modification. We show that MCT11 is localized to the endoplasmic reticulum, plasma membrane, mitochondria, nucleus, peroxisome and lipid droplet in rat and human hepatocytes through immunogold labelling and immunohistochemistry. We tested the expression of MCT11 in five different human tissues relevant to the physiopathology of T2D (liver, pancreas, thyroid, subcutaneous adipose tissue and visceral adipose tissue) and found higher expression in visceral adipose tissue compared to the other tissues analyzed. Moreover, we identified pancreatic α and β cells as a novel tissue expression site for MCT11, where no other MCT transporters had been reported to be expressed. Our findings suggest that MCT11 could be playing different roles in each tissue analyzed transporting diverse ligands.

Abreviaturas

ApoB Apolipoproteína B

ADA Asociación Americana de Diabetes

BSG Basigina, proteína chaperona

DAG Diacilgliceroles

DT2 Diabetes Tipo 2

ENSANUT Encuesta Nacional de Nutrición

GWAS Estudio de Asociación de Genoma Completo (*Genome-wide association study*)

HDL Lipoproteínas de Alta Densidad (*High density lipoprotein*)

HUFA Ácidos Grasos Altamente Insaturados (*Highly unsaturated fatty acid*)

LDL Lipoproteínas de Baja Densidad (*Low density lipoproteins*)

MCT Transportadores de Monocarboxilatos (*The monocarboxylate transporters*)

MODY Diabetes de la Edad Madura que se Presenta en el Joven (*Maturity-Onset-Diabetes of the Young*)

NALFD Enfermedad del hígado graso no alcohólico (*Non-alcoholic fatty liver disease*)

OMS Organización Mundial de la Salud

PDB Banco de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*)

RE Retículo Endoplásmico

SLC Acarreadores de Solutos (*Solute Carrier group*)

SNP Polimorfismo de un solo Nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)

TAG Triacilglicéridos

TM Hélices transmembranales

UPR Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (*Unfolded Protein Response*)

VLDL Lipoproteínas de muy Baja Densidad (*Very Low density lipoproteins*)

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	IX
Abreviaturas	XIII
1. Introducción	1
1.1. Diabetes	2
Diabetes tipo 2 (DT2) y dislipidemias	4
La acumulación de lípidos en organelos celulares durante la DT2	6
1.2. Estudios de asociación a Genoma completo y genes vinculados a la DT2	8
1.3. Haplotipo de riesgo para DT2 en el gen <i>SLC16A11</i> en población mexicana	10
1.4. El gen <i>SLC16A11</i>	11
La familia SLC	11
La familia SLC16	11
Clasificación de SLC16A11 (MCT11)	13
La proteína codificada por el gen <i>SLC16A11</i> (MCT11) y el haplotipo de riesgo	16
SLC16A11 (MCT11) y el metabolismo de lípidos	17

Función del gen <i>SLC16A11</i>	18
2. Objetivos	23
3. Hipótesis	25
4. Materiales y Métodos	27
4.1. Construcción de un Modelo Estructural	27
4.2. Simulaciones de acoplamiento molecular	28
4.3. Construcción de un árbol con herramientas filogenéticas	28
4.4. Transfección y sobreexpresión de SLC16A11 en HepG2 y HEK 293T	29
Plásmidos	29
Transfecciones transitorias	31
Evaluación de la expresión de MCT11	31
4.5. 2D SDS-PAGE	32
Aislamiento de mitocondrias	34
4.6. Análisis por medio de Inmunohistoquímica	35
Doble marcaje	36
4.7. Localización <i>in situ</i> de la proteína MCT11 mediante la tinción de	
inmuno-oro coloidal	37
5. Resultados	39
5.1. Construcción de un modelo estructural	39
Modelo por homología con I-TASSER	40
Modelo por homología con <i>SWISS-MODEL</i>	40
Modelo <i>de novo</i> con Robetta	44
Comparación de modelos	44
5.2. Simulaciones de acoplamiento molecular (<i>Molecular docking</i>)	47
Comparación de los sitios de unión de MCT1 y MCT11	54

5.3.	Construcción de un árbol con herramientas filogenéticas	57
5.4.	Caracterización bioquímica de MCT11 endógeno de muestras de hígado	59
5.5.	Transfecciones de la clona de cDNA del gen <i>SLC16A11</i> en HepG2 y en HEK293T	66
	El plásmido pLX304- <i>SLC16A11</i>	68
	Transfecciones en HepG2	70
5.6.	Distribución subcelular de MCT11	77
	Localización <i>in situ</i> de la proteína MCT11 mediante la tinción de inmuno-oro coloidal	77
	Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata	83
	Evaluación de la expresión de MCT11 en diferentes tejidos humanos y su colocación con diferentes organelos	84
	Evaluación de la expresión de MCT11 en tejidos humanos mediante réplicas tipo <i>Western blot</i>	86
	Colocalización de MCT11 con distintos organelos celulares en tejidos humanos utilizando Inmunohistoquímica	87
6.	Discusión	91
7.	Conclusiones y Perspectivas	97
7.1.	Conclusiones	97
7.2.	Perspectivas	98

Introducción

Todos los metazoarios son heterótrofos, es decir necesitan alimentarse consumiendo materia orgánica proveniente de otros seres vivos. Esta característica taxonómica plantea un desafío central, ya que las fuentes de nutrientes a menudo son escasas y las demandas energéticas cambian constantemente. Los animales equilibraron esta situación desarrollando mecanismos para promover el anabolismo cuando el suministro de calorías superaba las demandas, y promover el catabolismo cuando las demandas no podían satisfacerse con el consumo [1].

La secreción y la acción de la insulina proporcionaron una forma de regulación entre el catabolismo y el anabolismo, ya que tras el consumo de nutrientes, la insulina promueve la captación de carbohidratos en los sitios de almacenamiento clave e impulsa la conversión de carbohidratos y proteínas en lípidos, lo que constituye un almacenamiento más eficiente de energía [1]. A pesar de que esta capacidad de almacenar energía proveniente de los alimentos para tiempos posteriores sustentó el desarrollo de la vida animal por más de 600 millones de años, recientemente no ha sido una característica benéfica para los seres humanos [1].

El humano como especie, en un tiempo extremadamente corto, ha modificado el entorno de escasez energética y altas demandas calóricas a uno con abundante suministro de nutrientes y muy poca demanda energética. La obesidad es ahora un problema común y muchas poblaciones están lidiando con la creciente prevalencia

de enfermedades asociadas con la obesidad, en las que se incluyen el síndrome metabólico, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (*Nonalcoholic Fatty Liver Disease*, NALFD), la enfermedad cardíaca aterosclerótica y la Diabetes tipo 2 (DT2) [1]. Estas enfermedades causan altos costos en las sociedades a través de la pérdida de salud, la calidad de vida y altos recursos de los sistemas de salud.

1.1. Diabetes

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que a nivel mundial, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con este padecimiento con una cifra estimada en más de 415 millones de personas [2,3]. El aumento abrupto de la prevalencia se está produciendo especialmente en países en vías de desarrollo, aumentando 50% la prevalencia por década [4]. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, los países con mayor número de diabéticos son China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México [2]. Durante las últimas décadas, el número de personas que padecen esta enfermedad en México se ha incrementado y es la segunda causa de muerte en el país. Los datos de la última Encuesta Nacional de Nutrición (ENSANUT 2012) reportan el diagnóstico de 11.5 millones de adultos mexicanos entre 18-69 años, es decir una prevalencia del 18%.

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA), la diabetes mellitus consiste en una amplia variedad de condiciones metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia debido a una disminución en la utilización o sobreproducción endógena de glucosa, las cuales ocasionan defectos en la secreción o en la acción de la insulina o ambos [5]. Esta diversidad puede ser clasificada en cinco principales

formas:

- Diabetes tipo 1 (DT1). Esta forma de diabetes es inmunomediada por lo que anteriormente era referida como insulino-dependiente, sin embargo es poco común (del 5 al 10% de los casos). Es resultado de una destrucción autoinmune de células β -pancreáticas productoras de insulina, lo cual lleva a una deficiencia absoluta de insulina, por lo que el paciente depende de inyecciones de esta hormona para poder sobrevivir. Los marcadores de la destrucción inmune de las células β incluyen autoanticuerpos de las células en los islotes, autoanticuerpo a la insulina, autoanticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y autoanticuerpos a las fosfatasa de la tirosina IA-2 e IA-2 β [5].
- Diabetes tipo 2 (DT2). Es la forma más común de diabetes, y anteriormente era denominada como no insulino-dependiente. Se presenta en pacientes que muestran resistencia a la insulina y que generalmente tienen deficiencia relativa de insulina y no presentan destrucción autoinmune de las células β del páncreas. La mayoría de los pacientes son obesos, lo cual promueve la resistencia a la insulina. Esta forma de diabetes es frecuentemente no diagnosticada en etapas tempranas, debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y no es suficientemente severa para que el paciente observe cualquiera de los síntomas clásicos de la diabetes. El riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la edad, obesidad, y poca actividad física, además de estar asociada a una fuerte predisposición genética [5].
- Diabetes tipo MODY (*Maturity-Onset-Diabetes of the Young*). Es una forma de diabetes que está asociada con defectos monogénicos de las células β del páncreas. Se caracteriza por hiperglucemia en edades tempranas (antes de los 25 años), debido a una alteración en la secreción de insulina con efectos

mínimos de su acción. Esta enfermedad está determinada genéticamente puesto que existen mutaciones en 6 diferentes *loci* genéticos con una herencia autosómica dominante. Las formas más comunes de la diabetes tipo MODY están asociadas con mutaciones en el gen que codifica a HNF-1 α , y en el gen de la glucocinasa. Las formas menos comunes de esta enfermedad se dan debido a mutaciones en genes que codifican para los factores de transcripción HNF-4 α , HNF-1 β , IPF-1 y NeuroD1 [5].

- Diabetes Neonatal. Es una forma de diabetes permanente o transitoria que se diagnostica en los primeros seis meses de vida y no existe presencia de destrucción autoinmune en las células β del páncreas. El defecto genético más común causa una enfermedad transitoria debido a una mutación en ZAC/HYAMI, mientras que la diabetes neonatal permanente se debe otra variación en el gen KCNJ11 [5].
- Diabetes gestacional. Se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa de severidad variable que inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Aunque la mayoría de los casos se resuelven después del parto, la definición se aplica si la condición persiste o no después de éste [5].

Diabetes tipo 2 (DT2) y dislipidemias

En términos generales, la DT2 resulta de defectos en la secreción y acción de la insulina, lo cual está asociado al desarrollo de un fenotipo característico que consiste en altas concentraciones de triacilgliceroles (TAG) en plasma, un nivel bajo de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y una concentración elevada de proteínas de baja densidad (LDL) que en conjunto se conocen como dislipidemias [6, 7]. La patogenia precisa de las dislipidemias se desconoce, sin embargo un gran número

de evidencia sugiere que la resistencia a la insulina tiene un papel central en el desarrollo de esta condición [6]. Hasta el momento, se cree que la causa principal de las tres dislipidemias características de la diabetes es el aumento de la liberación de ácidos grasos libres de las células grasas resistentes a la insulina [6, 7]. El aumento del flujo de ácidos grasos libres en el hígado en presencia de reservas adecuadas del glucógeno promueve la producción de TAG, que a su vez estimula la secreción de apolipoproteína B (ApoB) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) [6, 7]. El deterioro de la capacidad de la insulina para inhibir la liberación de ácidos grasos libres conduce a una mayor producción hepática de VLDLs y se correlaciona con el grado de acumulación de grasa hepática [6, 7].

Por lo tanto, los lípidos están relacionados con la resistencia a la insulina, sin embargo aún no es claro si los lípidos circulantes en plasma o los lípidos acumulados en los tejidos sensibles a la insulina son los responsables de este efecto. Estudios en humanos han revelado que el contenido de TAGs en tejidos como músculo e hígado, son por mucho, unos mejores indicadores de resistencia a la insulina que los ácidos grasos circulantes [8]. Además, existen estudios que apoyan que la acumulación de DAG en el músculo puede llevar a la resistencia de a la insulina [9, 10]. La acumulación de lípidos ectópicos en el hígado, se denomina enfermedad del hígado graso no alcohólico (NALFD), y se considera la enfermedad hepática más común en América [11]. Muchas personas que padecen NALFD experimentan también un aumento del tejido adiposo visceral, y este tejido en especial ha sido implicado como un factor causante de la resistencia a la insulina hepática. Por lo que la acumulación ectópica de lípidos en el hígado puede específicamente causar resistencia hepática a la insulina [12, 13].

El hígado tiene un papel fundamental en el metabolismo de lípidos, principalmente en el transporte activo. La existencia de un balance entre la toma de lípidos hepáticos y la

exportación es de suma importancia, la cual fue demostrada en modelos murinos [14], en los que evidencian que el desarrollo de esteatosis hepática podría estar asociada a un desacoplamiento entre la captación y la exportación de lípidos hepáticos en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, es decir, la acumulación de lípidos ectópicos en el hígado, ya sea por un aumento en el suministro o por una menor exportación, puede conducir a la resistencia a la insulina hepática. Además de este factor, existen defectos genéticos en las rutas de oxidación mitocondrial de ácidos grasos que también pueden predisponer a la esteatosis hepática y a la resistencia a la insulina [15]. Sin embargo, los estudios en pacientes con NALFD dan resultados contradictorios, ya que algunos reportan una reducción [16, 17] y otros reportan un incremento en el metabolismo mitocondrial hepático [18].

La acumulación de lípidos en organelos celulares durante la DT2

La mayoría de los estudios que relacionan la acumulación ectópica de lípidos con la resistencia a la insulina se enfocan en el contenido total dentro de tejidos clave. Sin embargo aún no está claro si la localización intracelular de los lípidos es importante en relación con la resistencia a la insulina, ya que los lípidos son, después de todo, constituyentes celulares presentes en todas las membranas y en reservas de lípidos en organelos llamados vacuolas lipídicas o adiposomas. Los lípidos, además se esterifican en diversas moléculas de alta relevancia en el metabolismo como como la Coenzima A y la carnitina, por lo que aún se cuestiona si el contenido lipídico en diferentes compartimentos intracelulares afecta en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Aunque hasta el momento no existe una respuesta definitiva a esta interrogante, existen algunos estudios recientes que sugieren que la localización subcelular es un factor determinante e incluso se han desarrollado nuevas líneas de investigación en torno a este tema. Por ejemplo, en los últimos años ha habido un

gran auge en el estudio de las vacuolas lipídicas, ya que son ahora considerados sitios de síntesis activa de lípidos y de lipólisis, debido a que estos organelos poseen una variedad de enzimas que regula la entrada y salida de ciertos tipos de lípidos [1].

Un fenómeno relacionado con la resistencia hepática a la insulina que ocurre a nivel de organelo celular, es la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded protein response*, UPR), que también se denomina como estrés del retículo endoplásmico [1].

El retículo endoplásmico (RE) es el centro de muchos procesos celulares relevantes en las enfermedades metabólicas incluyendo la biosíntesis de lípidos, esteroides, nucleación, síntesis de vacuolas lipídicas, ensamblaje y tráfico de proteínas. Por lo que el RE es un organelo dinámico que tiene una asombrosa capacidad para adaptarse a las fluctuaciones de carga de trabajo, incluso a entornos celulares desventajosos a través de cambios coordinados en la tasa de síntesis de proteínas, su capacidad de plegamiento e incluso en la regulación de su tamaño [1].

La habilidad del RE de responder a estos cambios se explica mediante la activación de UPR, es decir, el censo de los niveles de proteínas mal plegadas. Este proceso se realiza mediante tres sensores integrales de membrana: *Enzima que requiere de inositol 1* (IRE1a), *RE cinasa similar a PKR* (PERK) y *factor de transcripción activador 6* (ATF6). En conjunto estas proteínas actúan para reducir las proteínas desplegadas en el lumen del RE aumentando la biogénesis de la membrana, deteniendo la traducción de proteínas y mejorando la expresión de las chaperonas en el RE. La activación de UPR está relacionada con la patogénesis de la resistencia a la insulina en ratones y humanos obesos [19], ya que en células β pancreáticas resistentes a insulina, la activación de UPR ha sido asociada con la capacidad del RE para solventar mayores demandas de procesamiento y secreción de insulina por lo que es considerada una función ventajosa. De manera similar, la inhibición de la

UPR podría conducir a una disfunción de las células β [20].

Una gran cantidad de trabajos se han enfocado en analizar la función de UPR en la patogénesis de la resistencia hepática a la insulina y NALFD, y en ellos han observado que UPR regula la lipogénesis, permite la expansión de la membrana del RE e incrementa la capacidad de RE de controlar el flujo de proteínas [20]. También se ha observado que la activación de UPR puede llevar a una esteatosis hepática transitoria, aunque en algunos modelos animales se ha observado que la delección de un solo componente de la UPR puede llevar al incremento de las vías de señalización de los componentes no afectados [21]. Esto hace evidente la relación entre UPR y varios aspectos del balance lipídico celular (lipogénesis, oxidación, etc.). En tejido adiposo, la activación de UPR parece regular el balance de energía. Aunque aún permanecen sin respuesta varios aspectos acerca de la activación de esta vía, es obvia la participación del RE en algunos procesos de la patología de la DT2 [14, 20–22].

1.2. Estudios de asociación a Genoma completo y genes vinculados a la DT2

Si bien la diabetes tipo 2 es un desorden metabólico influenciado por factores ambientales asociados con el estilo de vida (ingesta alta de calorías y poco ejercicio), se han documentado factores genéticos hereditarios de riesgo [4, 23]. En las últimas décadas se ha observado un importante aumento en prevalencia de DT2 en poblaciones grandes y con presencia de mestizaje, como es el caso de China, India, Japón, aborígenes australianos, afroamericanos e hispanoamericanos [4]. La prevalencia en este último grupo varía de acuerdo a la proporción de ancestría genética nativa americana [4, 24, 25].

Los estudios de asociación de genoma completo (*Genome-wide association studies*, GWAS), se han enfocado en mejorar en gran medida nuestra comprensión de las bases genéticas de las enfermedades comunes y complejas, ya que al realizar este tipo de estudio es posible analizar de 300 a 500,000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de varios miles de muestras de DNA [26]. Esta tecnología ha facilitado el rápido progreso de la investigación genética de la DT2, lo cual es aún más notable porque esta enfermedad no tiene un fuerte componente genético comparado con otros rasgos comunes, y los resultados son muy prometedores [26].

En los últimos 10 años los genetistas han dedicado una gran cantidad de esfuerzo en encontrar genes de riesgo para la DT2. Estos esfuerzos han incluido el estudio de muchos genes candidatos con su respectivo mapeo fino para encontrar señales de ligamiento entre ellos [26]. De estos análisis se han producido pruebas inequívocas de variantes comunes relacionadas con la DT2, por ejemplo, la variante E23K en el canal de rectificación interna del potasio, subfamilia J, miembro 11 (gen *KCNJ11*) [27, 28], la variante P12A en el receptor activado de proliferación de peroxisomas (gen *PPAR γ*) [29, 30], una variación común en el factor de transcripción hepático 2 (gen *TCF2*) [31, 32], además de los genes del síndrome Wolfram 1 (genes *WFS1*) [33]. Todos estos genes codifican para proteína que tienen un fuerte vínculo biológico con la diabetes ya que promueven la resistencia a la insulina.

Al día de hoy los estudios genéticos han identificado más de 100 *loci* asociados a un incremento en el riesgo de padecer DT2 de 10 al 20 %, sin embargo en la gran mayoría de los casos, los haplotipos abarcan varios genes por lo que el gen (o los genes) y las variantes causales no han sido identificados con precisión. En otros casos el *locus* contiene un gen directamente relacionado con los procesos implicados en la fisiopatología de DT2 como la secreción o sensibilidad a la insulina , pero la mayoría de las veces el gen candidato no es obvio [3].

El haplotipo de riesgo asociado a DT2 (Figura 1.1) incluye cinco polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que abarcan la región codificante del gen *SLC16A11*: 4 SNPs dan lugar a mutaciones con cambio de sentido (V113I, D127G, G340S y P443T) y 1 SNP silencioso en *SLC16A11* (L187L) [25].

Se ha identificado a *SLC16A11* como el gen de mayor contribución al riesgo de diabetes tipo 2 en la población mexicana [3, 24, 25], por lo que resulta fundamental entender su papel en los mecanismos fisiopatológicos que promuevan el desarrollo de esta enfermedad.

1.4. El gen *SLC16A11*

La familia SLC

El producto del gen *SLC16A11* pertenece a la superfamilia de los acarreadores de solutos (*Solute Carrier superfamily*, SLC), la cual consiste en alrededor de 400 de proteínas de membrana que mantienen la homeostasis celular mediante la regulación del transporte de muchos tipos de moléculas a través de las membranas lipídicas. La mayoría de los miembros de la superfamilia SLC, juegan un papel muy importante en varios procesos fisiológicos y metabólicos, como la detección de nutrientes [35], la homeostasis metabólica [36], la muerte celular [37, 38], entre muchos otros. Este gran grupo de proteínas está clasificada en 65 familias en función del tipo de ligando que transportan.

La familia SLC16

Las proteínas codificadas por los genes de la familia *SLC16* también son conocidas también como transportadores de monocarboxilatos (*Monocarboxylate transporter*,

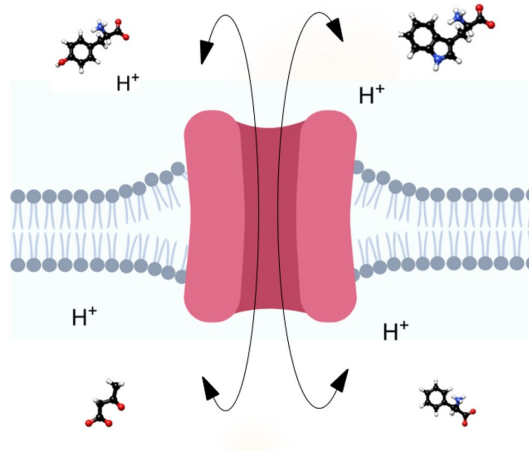


Figura 1.2: Representación gráfica de los diferentes ligandos que puede transportar la familia SLC16

MCT). Los MCTs se encargan del transporte de lactato, piruvato, cuerpos cetónicos, aminoácidos y hormonas tiroideas a favor de gradientes de concentración y a través de la membrana plasmática de las células (Figura 1.2). Este mecanismo es esencial para el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, además de ayudar a la regulación del pH en la mayoría de las células [39–41].

La familia de los MCT contiene 14 miembros y son proteínas transmembranales, de las cuales solo se han caracterizado seis y han sido divididos en dos tipos como se muestra en la figura 1.3 : Los tipo I, son transportadores de monocarboxilatos simples (como lactato, piruvato y cuerpos cetónicos) mediante un mecanismo acoplado a protones H^+ , los genes *SLC16A1*, *SLC16A3*, *SLC16A7* y *SLC16A8* codifican para las proteínas MCT1, MCT2, MCT3 y MCT4, las cuales pertenecen a esta clase; Los tipo II son transportadores de carboxilatos más complejos (de más de tres carbonos) e hidrofóbicos por difusión facilitada (aminoácidos aromáticos, triiodotiroxina (T3) y tiroxina (T4)), los genes *SLC16A2* y *SLC16A10* que codifican para las proteínas MCT8 y MCT10 forman parte de este segundo tipo [39, 40]. Solo los miembros de tipo I han mostrado tener interacción con las moléculas basigina (BSG) y embigina (EMB), proteínas chaperonas importantes para su translocación en la membrana

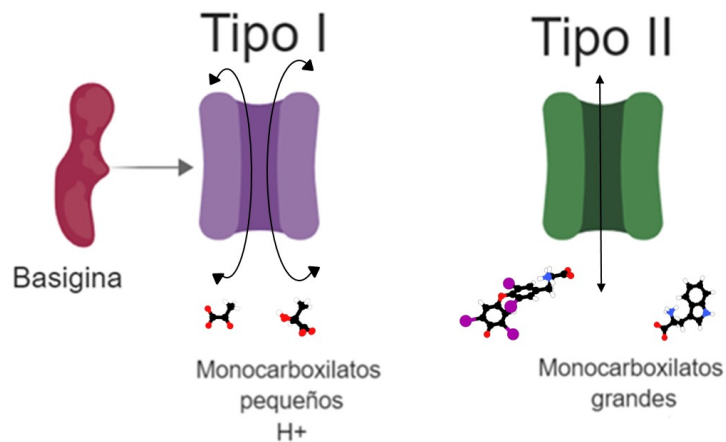


Figura 1.3: Clasificación de los transportadores MCT.

plasmática, mientras que los del tipo II no parecen tener esa interacción [39, 40, 42].

En el aspecto estructural, las gráficas de hidrofobicidad predicen para todos los miembros de la familia MCT, la presencia de 12 hélices transmembranales (TMs), con tres asas intracelulares correspondientes al N-terminal, C-terminal y un último más largo que une las TMs 6 y 7 [41]. A pesar de no contar con una estructura tridimensional, en 2009 Wilson y cols. [43], crearon un modelo por homología estructural de MCT1 utilizando a la estructura del transportador de glicerol fosfato de *Escherichia coli* G1pT (PDB: 1PWA) (1.4), que fue de utilidad para explicar observaciones experimentales obtenidas mediante estudios de inhibición y de mutagénesis dirigida, además también permitió proponer un posible mecanismo de translocación para transporte de ligandos.

Clasificación de SLC16A11 (MCT11)

MCT11, la proteína codificada por el gen *SLC16A11*, se clasificó como un transportador de tipo I por Rusu y colaboradores [3], apoyándose en varios criterios;

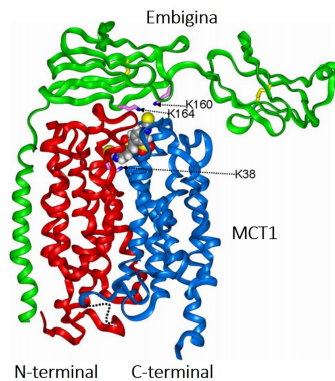


Figura 1.4: Modelo estructural de MCT1 asociado con Embígina. En rojo se muestra el N-terminal de MCT1, en azul el C-terminal de MCT1 y en verde Embígina. Modificado de [43]

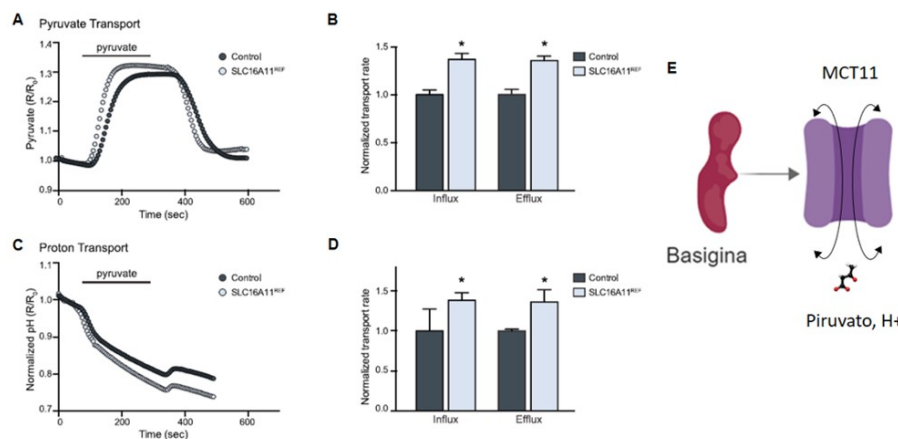


Figura 1.5: (A-D) Evaluación del flujo de piruvato y protones en células HEK293T que expresan MCT11 (SLC16A11) modificado de [3]. (E) Representación gráfica de la función de MCT11: interactúa con BSG, transporta piruvato y protones

el primero fue un alineamiento de secuencias en el que compararon a MCT11 con MCT1 un miembro del tipo I por excelencia, donde identificaron en MCT11 tres residuos cargados en una posición homóloga a los que posee MCT1 y que se ha comprobado que son responsables de la unión con el ligando. Otra evidencia que proveen estos autores es que demostraron que MCT11 es capaz de transportar piruvato y protones a través de la membrana plasmática en ambas direcciones (eflujo e influjo) en células HEK293T transfectadas (Figura 1.5), y además se demostró que MCT11 interacciona con la proteína chaperona Basígina (BSG) [3].

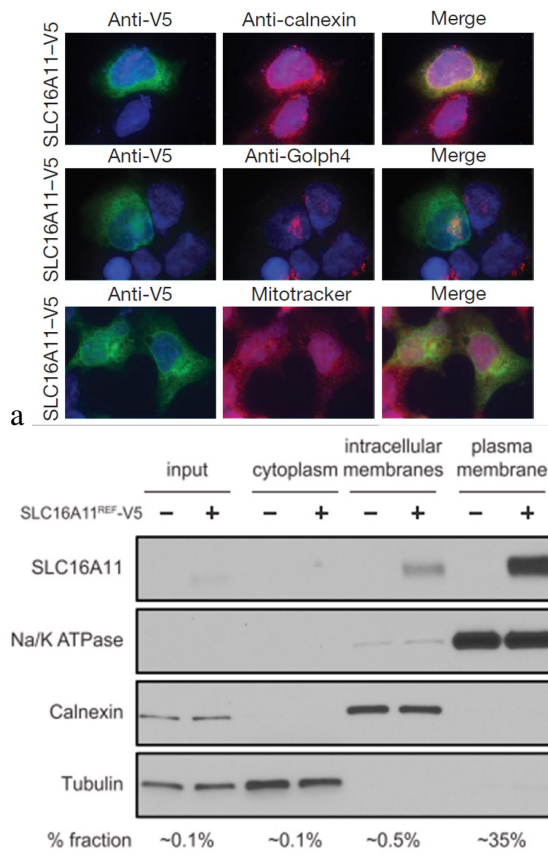


Figura 1.6: Distribución subcelular en células HeLa que expresan MCT11 (SLC16A11) (a) y en HEK293T que expresan MCT11 (SLC16A11) (b). Modificado de [3] y [25] respectivamente.

La distribución subcelular de MCT11 se ha explorado en dos líneas celulares transfectadas, en HeLa y en HEK293T, en las cuales se ha observado que la mayor parte de la proteína expresada se localiza en membranas en el interior de las células. Por ejemplo, en la línea celular HeLa se observó que la expresión de MCT11 se localiza en las membranas del retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondria (Figura 1.6) [25]; por su parte en la línea celular HEK293T se encontró que solo un 5% del total de la proteína MCT11 sobrepresada se encontraba asociada a la membrana plasmática, y que el 95% restante se encontraba adosada a membranas intracelulares (Figura 1.6) [3].

En el artículo publicado por el Consorcio SIGMA [25], se analizó la abundancia

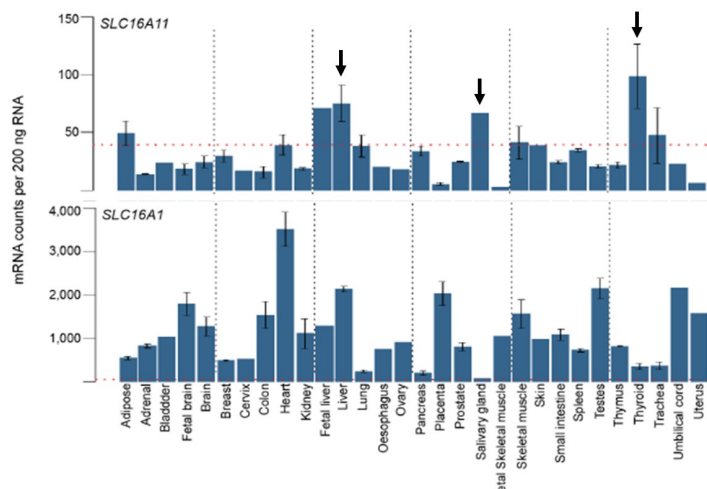


Figura 1.7: Cuantificación de la abundancia de mRNA de los genes *SLC16A1* y *SLC16A11* en diferentes tejidos humanos. Modificado de [25]

de mRNA de *SLC16A11* en diversos tejidos humanos (Figura 1.7), de los cuales el hígado, la tiroides y la glándula salival resultaron ser donde más abundancia había. Es probable que *SLC16A11* sea un gen de baja expresión, lo cual queda evidenciado al comparar con la abundancia de mRNA del gen *SLC16A1* (Figura 1.7).

La proteína codificada por el gen *SLC16A11* (MCT11) y el haplotipo de riesgo

En el trabajo de Rusu *et al.* se describen dos mecanismos que resultan en la disfunción del transportador MCT11 relacionados al riesgo para la DT2: primero una disminución de la expresión causada por variantes no codificantes en hígado y un segundo efecto que causa una alteración en la interacción con basigina (BSG) debido a las variantes codificantes (Figura 1.8). Con respecto al primer mecanismo, se identificaron 13 variantes genéticas en desequilibrio de ligamiento a través de mapeo fino, es decir, que las 13 variantes están asociadas de manera no aleatoria y son segregadas junto con las variantes del haplotipo de riesgo. De estas 13 variantes, tres se identificaron en la región promotora del gen *SLC16A11*, las cuales inducen una

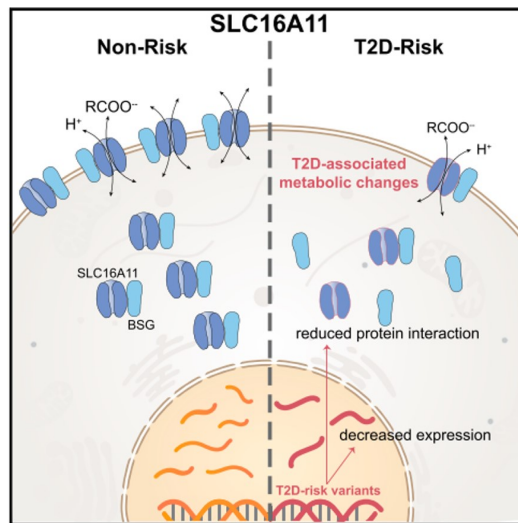


Figura 1.8: Efecto de las variantes de riesgo sobre el transportador SLC16A11. Modificado de [3].

baja en su expresión por lo que los portadores del haplotipo tienen una disminución del 42% para heterocigotos y una disminución del 66% para homocigotos en hígado. El segundo mecanismo involucra *per se* los aminoácidos que conforman el haplotipo de riesgo, ya que se especula que estos residuos participan en la interacción con la proteína BSG, por lo que la presencia del haplotipo en la proteína disminuye la interacción con BSG y ocasiona que no pueda translocarse en la membrana celular. Estas dos alteraciones causan que una menor cantidad de transportador se localice en la superficie celular [3].

SLC16A11 (MCT11) y el metabolismo de lípidos

Existen varias evidencias de que la modificación de la expresión de *SLC16A11*, ya sea sobreexpresión o silenciamiento, causan alteraciones en el metabolismo de lípidos. La primera de ellas fue presentada en el trabajo del consorcio SIGMA, en el que la sobreexpresión de *SLC16A11* en la línea celular HeLa causó un aumento significativo en los niveles intracelulares de triacilgliceroles (TAGs). Además, dado

que la síntesis de TAGs ocurre en el retículo endoplásmico del hígado, se tuvo un primer indicio de que SLC16A11 podría estar teniendo un rol en el metabolismo de lípidos hepáticos [25]. Tomando como base la evidencia anterior, en el trabajo de Rusu y cols. se reportó que en hepatocitos primarios humanos *knockdown* de *SLC16A11* hay un aumento significativo de acil-carnitinas, diacilglicerolos (DAGs) y TAGs, por lo que también concluyeron que la disminución de SLC16A11 afecta el metabolismo de lípidos y ácido grasos en el hígado [3]. Además, en un trabajo reciente publicado por Velentzas y cols., muestran que individuos *knockdown* para un gen homólogo a *SLC16A11*, llamado hermes en *Drosophila melanogaster*, causa alteración en el metabolismo de lípidos, ya que altera significativamente el tamaño de las vacuolas lipídicas observados en este organismo [38].

Cabe mencionar que estos cambios metabólicos asociados a SLC16A11, es decir la acumulación de TAGs, DAGs y lípidos, están descritos como un factor de riesgo para las fisiopatologías de la obesidad, el síndrome metabólico, el hígado graso no alcohólico y la diabetes tipo 2 [25].

Función del gen *SLC16A11*

Como se detalló en la sección anterior, el primer trabajo donde se explora el probable efecto del haplotipo de riesgo de *SLC16A11* de manera *in vitro*, fue publicado por Rusu y colaboradores [3]. En este estudio se mostró que la proteína codificada por el gen *SLC16A11* funciona como transportador de piruvato, además de que las variantes genéticas en el *locus* 17p13 tienen dos efectos distintos sobre SLC16A11. Primeramente, las variantes no codificantes llevan a una disminución de la expresión génica de *SLC16A11* en hígado, mientras que las variantes codificantes afectan la interacción con proteína MCT11 con BSG, reduciendo así la cantidad de transportador en la superficie celular. También mostraron que la alteración en la

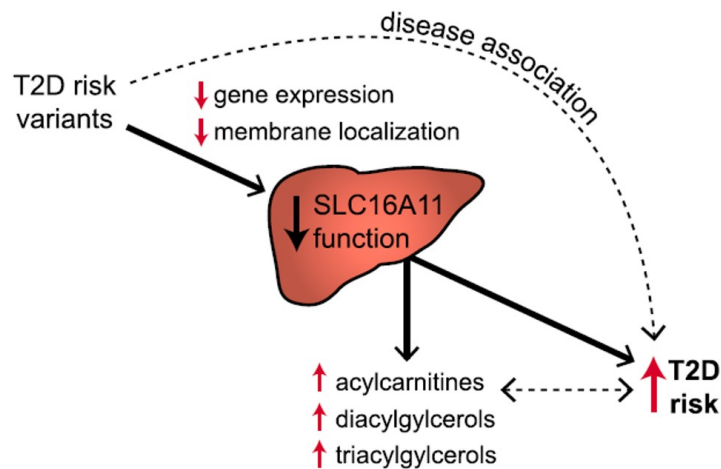


Figura 1.9: Efectos del haplotipo de riesgo sobre SLC16A11 en hígado. Modificado de [3]

expresión de *SLC16A11* en hepatocitos primarios humanos perturba el metabolismo de ácidos grasos y lípidos (Figura 1.9)

A partir de este antecedente, se publicó otro trabajo realizado por Kim y cols. [44], donde se describe un nuevo mecanismo para el reciclaje de NAD^+ que involucra a las desaturasas D6D y D5D con la función de SLC16A11 como transportador de piruvato. De esta manera, se sugiere una posible asociación entre las variantes de riesgo en SLC16A11 con la alteración del metabolismo de lípidos. La ruta metabólica descrita detalla que la producción de ácidos grasos altamente insaturados (*highly unsaturated fatty acids*, HUFA) provee un mecanismo de reciclaje para el NAD^+ que se produce por vía glucolítica, de manera análoga a la fermentación láctica. En este trabajo, los autores describen que el haplotipo de riesgo en SLC16A11 reduce la capacidad de transporte de piruvato a través de la membrana celular, lo cual reduce la relación $NAD^+/NADH$ e incrementa la síntesis de HUFA y TAGs. También se describe que los efectos mencionados pueden ser revertidos mediante la suplementación con piruvato.

El aporte de este trabajo fue el resaltar la interacción bioquímica entre la producción

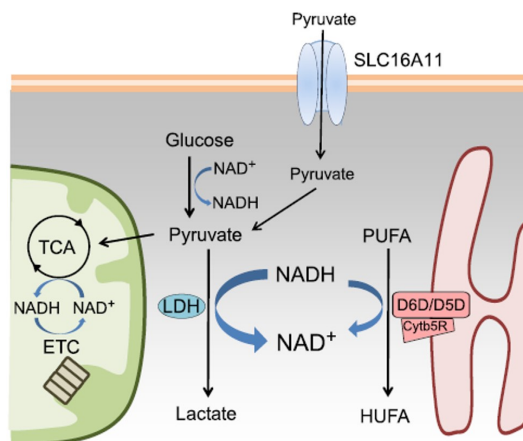


Figura 1.10: Mecanismo de reciclaje de HUFA que recicla NAD^+ que involucra a SLC16A11 como transportador de piruvato. Modificado de [44]

de lactato y HUFA durante la glucólisis, además de proporcionar un mecanismo que relaciona la reducción del transporte de lactato a través de la membrana celular con la modulación directa del metabolismo de lípidos y la disminución de la función de SLC16A11 (Figura 1.10).

Por otra parte, de manera reciente, Zhao y colaboradores [45], publicaron un estudio donde examinaron la contribución de MCT11 en la regulación metabólica mediante la generación de un ratón *knockout* para *SLC16A11*. Sobre este modelo se estudió la influencia de las variantes de riesgo mediante la reconstitución de la expresión de la proteína mutante de SLC16A11 en hígado (Figura 1.11). A partir de sus resultados experimentales surgieron tres conclusiones principales:

1. Al eliminar por completo la expresión de *SLC16A11* en modelos animales y en células en cultivo hepáticas, no se produce ningún efecto metabólico significativo.
2. Las 5 variantes que conforman el haplotipo de riesgo en el gen *SLC16A11* producen una proteína mutante con ganancia de función, la cual está involucrada con el riesgo a DT2 ya que causa acumulación de lípidos en

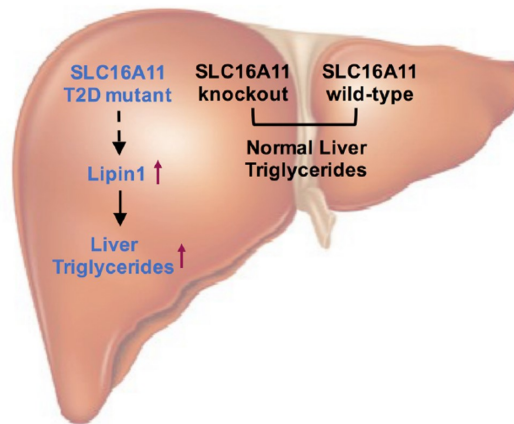


Figura 1.11: Las variantes del haplotipo de riesgo producen una mutante con ganancia de función que afecta al metabolismo de lípidos. Modificado de [45]

sangre e hígado de ratón, además de que induce resistencia a la insulina en los animales.

3. La razón por la que las mutantes en *SLC16A11* causan un incremento en la acumulación de lípidos en hígado se debe en parte porque están asociadas a un aumento en la expresión de Lipina 1 (*Lpin1*), una enzima que participa en la formación de DAGs y TAGs.

Las conclusiones del artículo de Zhao y cols., fueron totalmente contradictorias con el estudio previo de Rusu y cols. [3], donde la principal premisa sugiere que las variantes de riesgo producen una proteína mutante con pérdida de función que produce un aumento de lípidos. Mientras que Zhao demostró que la disminución de la expresión de *SLC16A11* no lleva directamente a defectos metabólicos significativos y que la proteína mutante que posee los 5 SNPs del haplotipo de riesgo produce resistencia a la insulina y aumento en la acumulación de lípidos en el hígado debido a una ganancia de función y que puede estar relacionada con la función de la proteína Lipina 1.

Las conclusiones de este artículo cuestionan fuertemente el paradigma de la pérdida de función de MCT11 que se había implementado desde el 2017 y que había sido

la hipótesis principal para relacionar las variantes de riesgo con la enfermedad multifactorial de la DT2.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar *in silico* la estructura del transportador SLC16A11 y estudiar su distribución subcelular en células hepáticas humanas y de rata.

Objetivos específicos

1. Construir un modelo estructural del transportador MCT11 (SLC16A11) para su utilización en simulaciones de acoplamiento molecular (*molecular docking*) e identificar sus posibles ligandos.
2. Reconstruir las relaciones evolutivas entre los miembros de la familia MCT con herramientas filogenéticas.
3. Caracterizar bioquímicamente la proteína MCT11 endógena de hígado de humano y de rata.
4. Aislar mitocondrias de hígado de rata para identificar la expresión de MCT11 (SLC16A11) en este organelo.
5. Evaluar la localización subcelular de MCT11 en la línea celular HepG2 y en hígado de rata mediante inmuno-oro coloidal.
6. Localizar MCT11 en distintos organelos celulares en cinco diferentes tejidos

humanos relacionados con la fisiopatología de la DT2.

7. Evaluar el nivel de expresión de MCT11 en cinco diferentes tejidos humanos relacionados con la fisiopatología de la DT2.

Hipótesis

- La proteína MCT11 (SLC16A11) es capaz de transportar otros monocarboxilatos además del piruvato y se localiza en distintos compartimientos celulares, principalmente en organelos involucrados en la oxidación de ácidos grasos.

Materiales y Métodos

4.1. Construcción de un Modelo Estructural

Para la construcción de los modelos estructurales se emplearon tres softwares diferentes: *I-TASSER*, *Robetta* y *SWISS-MODEL*, utilizando la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por SLC16A11 (Número de acceso Q8NCK7.1, secuencia disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q8NCK7.1?report=fasta>)

I-TASSER (iterative threading assembly refinement) es una herramienta bioinformática para la predicción de modelos estructurales de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos. La metodología del algoritmo de I-TASSER está descrita en [46–49]. El servidor *online* de I-TASSER se encuentra disponible en: <http://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/I-TASSER/>

Robetta usa una implementación totalmente automatizada del Software Rosetta para la predicción de estructuras de proteínas. Los métodos de Rosetta están descritos en detalle en las referencias: [50–52]. El servidor de *Robetta* está disponible en la siguiente dirección electrónica: <http://robetta.bakerlab.org/>

SWISS-MODEL es un servidor web de bioinformática estructural dedicado al modelado por homología de estructuras tridimensionales de proteínas. Los detalles

de la metodología empleada por SWISS-MODEL están reportados en [53–55]. El servidor de *SWISS-MODEL* está disponible en la siguiente dirección electrónica: <https://swissmodel.expasy.org/>

4.2. Simulaciones de acoplamiento molecular

Para las simulaciones de acoplamiento molecular, se utilizaron las coordenadas de MCT11 generadas por el servidor *Robetta*. La simulación se realizó con el software *Autodock Vina*, [56] y la Visualización y generación de imágenes fue hecha con *UCSF Chimera* [57].

4.3. Construcción de un árbol con herramientas filogenéticas

Para obtener las secuencias protéicas de toda la familia MCT se realizó un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en el genoma de *Homo sapiens sapiens* [58, 59], utilizando como secuencia semilla el gen *SLC16A11* (Número de acceso Q8NCK7.1, secuencia disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q8NCK7.1?report=fasta>). Se eligieron solo los 14 miembros de la familia de transportadores de monocarboxilatos. El alineamiento se realizó en el programa *MAFFT* versión 7.1 [60, 61]. Posteriormente se determinó el esquema de partición óptimo para el alineamiento usando el programa *Partition Finder 2* que corre sobre *Phyton* versión 2.7 [62]. El análisis filogenético se realizó por Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*), asumiendo un modelo de sustitución $GTR + \Gamma$ con el programa *RAxML version 8* [63]. El soporte de los clados fue evaluado con 100 réplicas de *bootstrap*.

4.4. Transfección y sobreexpresión de SLC16A11 en HepG2 y HEK 293T

Plásmidos

El plásmido que se utilizó para sobre-expresar MCT11 es el pLX304 (*Addgene plasmid 25890*) [64], un vector lentiviral de tercera generación que contiene clonado el cDNA del gen SLC16A11 y una etiqueta del péptido V5 en su carboxilo terminal. La expresión del gen en células eucariontes está controlada por el promotor de citomegalovirus (CMV) y además posee resistencia a Ampicilina (figura 4.1a). También se utilizó como control de transfección el plásmido lentiviral pReceiver-M03 (*GeneCopoeia*), que contiene la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo del control del promotor CMV además de tener resistencia a Ampicilina (Figura 4.1b). Los plásmidos se usaron para transformar la cepa de *E. coli* quimiocompetente DH5 α , mediante choque térmico. Posteriormente las bacterias transformantes se crecieron en cajas de Petri con medio sólido Luria-Bertani (LB) adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina. Utilizando colonias aisladas se inoculó un cultivo de medio líquido de 10 ml y se incubó con agitación de 250 rpm a 37°C por 12 horas, de este cultivo se usaron 5 ml y se inoculó un matraz con 100 ml de LB antibiótico a la misma concentración, este matraz se incubó a una agitación de 300 rpm a 37°C hasta que el cultivo llegó a una densidad óptica de 0.8-1 a 600 nm. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación y se extrajo el DNA plasmídico mediante el kit *Midiprep, Qiagen* siguiendo las instrucciones del fabricante.

El plásmido pLX304-SLC16A11 fue secuenciado en su totalidad utilizando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 4.1.

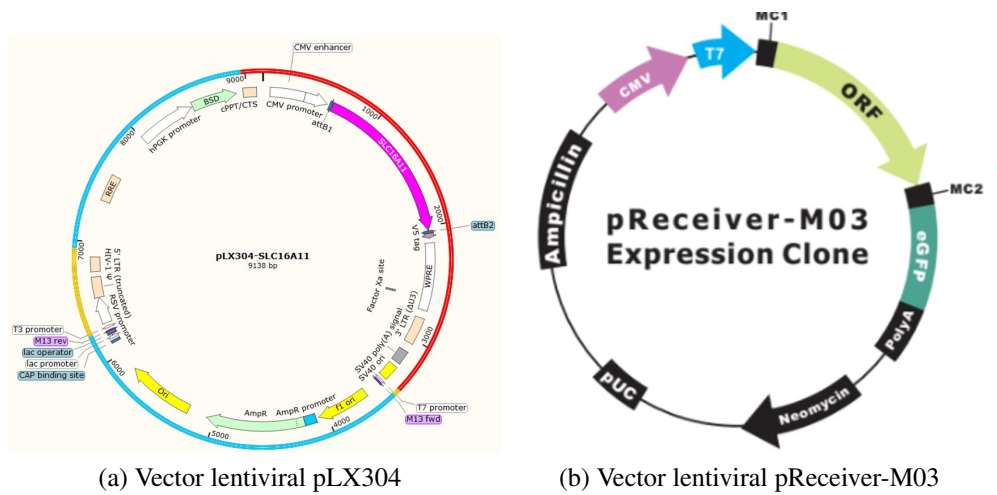


Figura 4.1: Plásmidos utilizados en las transfecciones transitorias

Nombre	Secuencia	No. Nucleótidos	Tm
WPRE-F	tgg tgt gca ctg tgt ttg c	19	56.7
SV40-F	ctt atc atg tct ggc tct agc	21	52.5
AmpR-F	cat cga actg gat ctc aac agc	22	55.8
AmpR-R	ata ata ccg cgc cac ata gc	20	55.2
AmpR2-F	gtc tcg cgg tat cat tgc	18	53.6
RSV-R	cat taa gct tgc agc tcc agc	21	56.9
HIV1-F	tag aag gag aga gat ggg tgc	21	55.6
RRE-F	tct ggt ata gtg cag cag c	19	54.5
hPGK-F	tct cgc aca ttc ttc acg	18	52.5
BSD-F	tgg caa cct gac ttg tat cg	20	54.9

Tabla 4.1: Oligonucleótidos diseñados par aseguenciar el plásmido pLX304

Transfecciones transitorias

Las líneas celulares HepG2 (*ATCC HB-8065*) y 293T (HEK293) (*ATCC CRL-1573*) se cultivaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor en Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina, en una incubadora de CO_2 humificada a 37 °C. Los cultivos se dejaron crecer hasta un 80% de confluencia en botellas T75.

Para las transfecciones, se transfirieron las células de una botella T75 confluyente a placas de 6 pozos a una densidad de 6×10^5 células por pozo, 24 horas antes del experimento. Se usó lipofectamina 3000 para la línea celular HepG2 y Lipofectamina LTX Reagent para la línea HEK293T. En ambos sistemas se siguieron las instrucciones del fabricante (*Thermo Fisher Scientific*) y la expresión se evaluó 48 h después de la transfección mediante inmunodetección.

Evaluación de la expresión de MCT11

La evaluación de la expresión de MCT11 se realizó por inmunodetección. Para ello se desprendieron las células de cada pozo de la placa con un gendarme (scraper) y se obtuvo un extracto total de las células y se cuantificó su contenido proteico por el método colorimétrico del Ácido Bicinconínico (BCA) (*Thermo Fisher Scientific*), con una curva estándar de BSA y midiendo su absorbancia por espectrometría a 562nm. Se cargaron 20 μg de proteína de cada una de las muestras, es decir, del extracto de HepG2 control y de los extractos transfectado, en un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes empleando el método de Laemli (SDS-PAGE) [65]. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el método de Towbin [66]. Posteriormente, la membrana se bloqueó con solución de amortiguador TBS-Tween

(50 mM Tris base, 155 mM NaCl, pH 7.6, 0.05 % Tween 20) y leche en polvo al 5 % a temperatura ambiente en agitación durante 1 hora. La membrana se incubó en una disolución de amortiguador TBS-Tween y anticuerpo primario contra la etiqueta del plásmido de la proteína recombinante (Anti-V5) y/o contra la proteína (Anti-MCT11) a dos diluciones diferentes 1:500 y 1:1000 y 1 % de Albúmina, a 4°C durante 16 horas. Posteriormente se hizo una serie de lavados con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo secundario anti-cabra a una dilución de 1:10000 con TBS-Tween por 45 min en agitación constante. Se utilizaron como marcadores constitutivos α -tubulina (1:8000) y β -actina (1:4000). Se hicieron una serie de lavados con TBS-Tween y se reveló con una mezcla 1:1 de peróxido y luminol (*Thermo Scientific SuperSignal West Pico*).

4.5. 2D SDS-PAGE

Se analizó el patrón electroforético mediante separación en 2D SDS-PAGE de una muestra de hígado de humano. Se modificó ligeramente el método de Bjellqvist y cols. [67], descrito a continuación. Se partió de 10g de tejido de hígado congelado (-80°C), el cual fue sumergido en amortiguador de lisis a 4 °C(100 mM TRIS pH 8.8, 5 mM EDTA, 20 mM DTT, 2 mM PMSF y 30 % de sacarosa) y se dejó reposar durante 10 min, posteriormente la muestra fue procesada con un homogenizador hasta que el tejido quedó completamente desintegrado. El lisado se centrifugó a 4000 rpm (2504 x g) por 15 min a 4 °C, se descartó el botón y se continuó procesando el sobrenadante. A este, se le agregaron 20 ml de fenol al 30 % y se centrifugó nuevamente a 4000 rpm (2504 x g) 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase fenólica y se añadió 1:5 (v/v) volúmenes de acetato de amonio 0.1 M diluído en metanol y se dejó precipitando a -80 °C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 4000 rpm (2504 x g) por 20 min y se lavó tres veces con acetato de amonio-metanol. El último

lavado se realizó con acetona al 99.9%, luego de la centrifugación se descartó la acetona y dejó evaporar boca abajo sin llegar a la sequedad. El botón se resuspendió en 1 ml de amortiguador desnaturante (8M urea, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 2% Tritón X 100 y 50 mM de DTT). Se estimó la concentración de la muestra mediante el método del BCA.

Cada procedimiento descrito a continuación se realizó por duplicado para crear dos geles 2D de manera simultánea.

Para la rehidratación y la focalización de la muestra se utilizaron 500 μ g de proteína resuspendida en 215 μ l de amortiguador desnaturante, la cual se aplicó en una tira de gel de poliacrilamida de 11 cm con un gradiente inmovilizador de pH (*IPG BioRad*) de un rango de 3-10 durante 10 min a temperatura ambiente en una bandeja de rehidratación (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray, BioRad*). Posteriormente las tiras se cubrieron con aceite mineral y la bandeja se transfirió a la unidad de isoelectroenfoque PROTEAN i12 IEF Cell (*BioRad*) para rehidratarlas activamente 12 h a 20 °C, seguida de 5 pasos de focalización: 500 V por 30 min (rápida), 1000 V por 1 h (gradiente), 3000 V por 1 h (gradiente), 5000 V por 2 h (gradiente) y 8000 V (rápida) por 3 h, hasta un voltaje acumulado de 30-35 kVh.

Tras el iso-electro-enfoque, las tiras IPG fueron removidas de la charola, se eliminó el aceite mineral, y se incubó con un amortiguador de equilibrio SDS (Tris-HCL 1.5 M pH 8.8, urea 6 M, 30% (v/v) Glicerol, 5% SDS y 2% DTT). Las tiras se incubaron en esta solución durante 15 min en agitación y temperatura ambiente. Se repitió la incubación 2 veces. Posteriormente se incubó con un amortiguador de alquilación SDS (Tris-HCL 1.5 M pH 8.8, urea 6 M, 30% (v/v) Glicerol, 5% SDS y 2.5% Iodoacetamida) durante 15 min en agitación y temperatura ambiente. La incubación se repitió 2 veces más. Después se hizo un breve lavado con amortiguador de corrida de proteínas SDS 1X. De esta manera las tiras quedaron listas para llevar

a cabo la segunda dimensión.

La corrida de los geles 2D se realizó como se describe a continuación: para las tiras de 11 cm se utilizó el sistema de electroforesis SE600 VERTICAL UNIT (*GE-HEALTHCARE*), empleando geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 % de 16 x 15 cm polimerizados en una cámara de polimerización del mismo sistema, donde cada tira IPG se colocó en la superficie del gel. Para fijar los geles y evitar pérdidas de proteínas se añadió una solución de agarosa 0.5 % en amortiguador de corrida SDS-PAGE y con trazas de azul de bromofenol. La electroforesis se realizó a 25 °C con un voltaje constante de 50 V por 22 horas a temperatura ambiente en un amortiguador de corrida SDS-PAGE.

Finalizada la electroforesis, se realizó un primer paso de fijación incubando uno de los geles en una solución de 50 % (v/v) metanol/agua durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se retiró la solución de fijación y se incubaron los geles en solución de tinción (8 % sulfato amónico, 2 % ácido fosfórico, 20 % etanol y 0.1 % azul de Coomassie G-250) durante 16 h en agitación a temperatura ambiente. Finalmente se destiñó el gel con agua bidestilada hasta alcanzar el contraste adecuado para la identificación de las manchas.

El otro gel restante se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se realizó una inmuno-réplica tipo *Western blot*, utilizando el anticuerpo contra MCT11 a una dilución 1:500 para detectar la señal de la proteína.

Aislamiento de mitocondrias

Para el aislamiento de mitocondrias se modificó ligeramente el protocolo publicado por Moreno-Sánchez en 1985 [68], descrito a continuación.

Se utilizó una rata macho (cepa *Wistar*) de aproximadamente 300 g a la cual se le

Sexo	Edad	Dx Histopatológico
Mujer	39 años	Mieloma múltiple, infección fungica
Hombre	42 años	Cardiomiopatía dilatada

Tabla 4.2: Características de los donadores cadavéricos de tejidos humanos

realizó la extracción del hígado. El órgano se sumergió de manera inmediata en 25 ml de amortiguador SHE (Sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM y EGTA 1mM pH 7.3) a 4°C y se cortó en pedazos pequeños. Posteriormente se utilizó un homogenizador de tejidos de émbolo de vidrio para lisar el tejido. El líquido resultante se centrifugó a 2000 rpm (344 x g) durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de una gasa humedecida con amortiguador SHE. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 9500 rpm (8268 x g) durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se retiró y el botón se resuspendió en 1 ml de amortiguador SHE, el cual se incubó durante 10 min con albúmina al 0.1 %. Tras la incubación, se resuspendió en un volumen de 30 ml de amortiguador SHE y se centrifugo nuevamente a 9800 rpm (8268 x g) durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y el botón se resuspendió en 1 ml de amortiguador SHE. La concentración de proteína total del concentrado de mitocondrias resultante se determinó mediante el método del BCA.

4.6. Análisis por medio de Inmunohistoquímica

Las muestras de tejidos humanos utilizadas en este trabajo provienen de dos autopsias realizadas en el departamento de Patología del INCMNSZ, las características de los donantes se muestran en la tabla 4.2.

Para determinar la expresión de MCT11 en cada tejido, se tomaron secciones delgadas de 4 μ m de la muestra fijada en formalina y embebida en parafina proveniente de: dos hígados, dos páncreas, dos tiroides, dos tejidos adiposos

viscerales y dos tejidos adiposos subcutáneos. Las muestras fueron colocadas en portaobjetos positivamente cargados. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron a través de una serie de xileno y alcoholes de diferentes grados. La evaluación morfométrica de las secciones inmuno-marcadas se analizaron de manera ciega.

Doble marcaje

Luego de la desparafinación y la separación de antígenos con el reactivo de la recuperación del antígeno enzimático de inmunohistoquímica (*IHCh, Enzo Life Sciences*) por 2 min, los tejidos fueron bloqueados con 3% H₂O₂ durante 20 min. Posteriormente se evitó la tinción de fondo no específica, con un bloqueador de fondo *IHCh (Enzo Life Sciences)*. Para determinar las co-localizaciones de MCT11, con diferentes organelos (núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisoma). Se utilizó una detección simultánea con MultiView mouse-HRP/mouse-AP (*Enzo Life Sciences*). El procedimiento fue una tinción secuencial doble donde el anticuerpo monoclonal anti-MCT11 (*Santa Cruz Biotechnology*) fue utilizado a una concentración de 10 µmL durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después los tejidos fueron incubados con el reactivo PolyView *IHCh (mouse-HRP)* por 20 min. Posteriormente las laminillas fueron lavadas. Los antígenos se visualizaron usando peroxidasa de rábano (HRP)/3, 3'-diaminobencidina (DAB). Las muestras se lavaron e incubaron con los anticuerpos monoclonales por separado: anti-Lámina, anti-Calnexina, anti-ATP5a1, y anti-catalasa (*Santa Cruz Biotechnology*) a 10 µg/mL durante 30 min a temperatura ambiente. Después las laminillas fueron incubadas con PolyView *IHCh reagent (mouse-AP)* por 20 minutos. Los antígenos se visualizaron usando fosfatasa alcalina (AP)/Permanet Red. Los tejidos fueron contrastados con hematoxilina de Mayer (*SIGMA-Aldrich*) y se montaron en medio acuoso. Las tinciones control negativas fueron realizadas con el reactivo de control negativo

universal diseñado específicamente para funcionar con anticuerpos de conejo, ratón, y cabra (*IHCh universal negative control reagent, Enzo Life Sciences, Inc.*). El reactivo blanco fue incubado con amortiguador de fosfatos salino con albúmina de huevo (*SIGMA-Aldrich*), en lugar de anticuerpo primario. Ambos controles excluyeron tinciones no específicas y actividades enzimáticas endógenas.

4.7. Localización *in situ* de la proteína MCT11 mediante la tinción de inmuno-oro coloidal

Para su procesamiento, las células HepG2 se crecieron en botellas T75 hasta un 80 % de confluencia, se desprendieron con un método enzimático y se centrifugaron para generar un botón muy denso de material celular, en el caso del hígado de rata se fijó un pequeño fragmento de 1 mm³. Este botón y el fragmento de hígado se fijaron en paraformaldehído al 4 % en amortiguador de Sörensen (133 mM Na₂HPO₄, 133 mM KH₂PO₄, pH 7.2) por 4h. Las muestras fueron deshidratadas dejándolas en alcoholes etílicos graduados de 30, 50, 70, 80 y 96 durante 15 min dos veces y finalmente en alcohol etílico al 100 % 15 minutos dos veces también. La infiltración se hizo en resina acrílica hidrosoluble *LR-White* con alcohol etílico absoluto en una proporción 1:2 durante 4h. Posteriormente se hizo una nueva infiltración en una disolución de 50 % resina acrílica y 50 % etanol absoluto durante 4h. La inclusión se hizo en resina acrílica hidrosoluble expuesta a luz UV durante 12h. Se realizaron cortes semifinos de 1 μm, y se tiñeron con azul de toluidina al 1 % para su evaluación en el microscopio de luz. También se realizaron cortes finos de 90 nm, los cuales se montaron en rejillas de níquel de 200 mesh. La incubación con el anticuerpo primario anti-MCT11 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) se realizó en diferentes diluciones (1:100, 1:200, 1:300 y 1:400) por 8h. La incubación con anticuerpo secundario (IgG anti-conejo

acoplado a oro coloidal con partículas de 10 nm) en una dilución 1:10 se hizo durante 1.5 h. Las muestras se contrastaron con acetato de uranilo al 3% en una solución alcohólica durante 30 s. Los cortes con la tinción fueron visualizados en un microscopio electrónico FEI Tecnai Biotwin (LaB6, 80 kV).

Resultados

5.1. Construcción de un modelo estructural

Dado que el transportador SLC16A11 (MCT11) no posee estructura cristalográfica y es de vital importancia evaluar la función de esta proteína, fue necesario generar un modelo estructural.

El mejor método de predicción de estructura de una proteína depende de si existe una secuencia homóloga con estructura conocida. Si la identidad entre las secuencias es alta, se pueden construir modelos muy precisos utilizando la estructura conocida como molde. Por otra parte, en ausencia de identidad, se pueden construir modelos usando métodos de predicción *de novo*, los cuales no utilizan una estructura como plantilla [69]. En muchos casos, el uso de una estrategia donde se utilicen ambos métodos puede ser más apropiado: porciones de una secuencia dada pueden ser modelados basados en una plantilla, mientras que bucles variables largos, asas, dominios extra o extensiones no contenidas en el molde se pueden modelar usando métodos *de novo* [69].

La secuencia proteica del transportador MCT11 tiene pocas secuencias homólogas que cuenten con estructura reportada, y las existentes poseen una identidad baja (alrededor del 10%). Por esta razón se generaron modelos estructurales con ambos

métodos, se utilizaron los servidores de *I-TASSER* y *SWISSMODEL* para generar un modelo por homología y el servidor *Robetta* para generar un modelo *de novo*.

Modelo por homología con I-TASSER

La plataforma del servidor *online I-TASSER* (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), permite predecir la estructura tridimensional de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos utilizando secuencias homólogas con estructura [46, 48, 49].

El servidor generó cinco modelos diferentes, pero solo se eligió el que tenía un *C-score* mayor (-1.14) (Figura 5.1). El *C-score* es una medida de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos por *I-TASSER*, el cual es calculado con base en la significancia del templado del alineamiento y la convergencia de los parámetros de las simulaciones de ensamblaje de la estructura. El *C-score* va de un rango de $[-5, 2]$, mientras el *C-score* tenga un valor alto, el modelo es confiable y viceversa. El modelo se construyó con base en las estructuras de la base de datos de proteínas (*Protein Data Bank, PDB: 3WDO, 1PW4 y 3O7Q*; (Tabla 5.1).

Modelo por homología con SWISS-MODEL

SWISS-MODEL es una plataforma integrada basada en la web dedicada al modelado por homología de estructuras de proteínas.

La construcción de un modelo por homología en esta plataforma comprende cuatro pasos principales:

1. Identificación de una (o varias) plantilla estructural
2. Alineamiento de la secuencia de la plantilla con la de interés

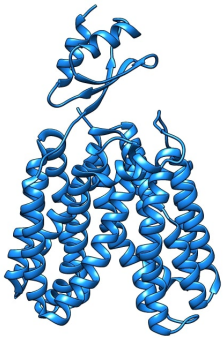

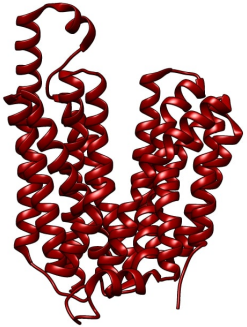
PDB	Proteína	Organismo	Estructura
3WDO	Transportador YajR	<i>Escherichia coli</i>	
1PW4	Transportador de glicerol-3-fosfato	<i>Escherichia coli</i>	
3O7Q	Transportador de L-fucosa	<i>Escherichia coli</i>	

Tabla 5.1: Estructuras del *PDB* utilizadas por *I-TASSER* para generar el modelo estructural

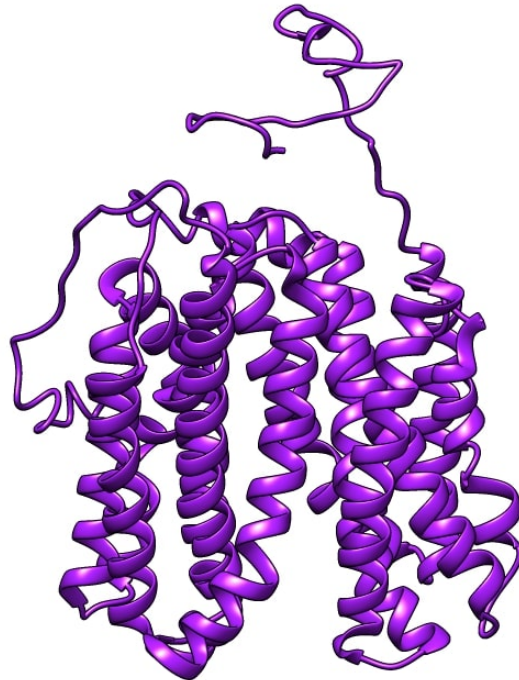


Figura 5.1: Modelo por homología de MCT11 generado por el servidor **I-TASSER**

3. Construcción del modelo

4. Evaluación de la calidad del modelo

Estos pasos requieren un software especializado y la integración de bases de secuencias y estructuras de proteínas actualizadas. Cada uno de los pasos anteriores se puede repetir de manera iterativa hasta que se logre un resultado de modelado satisfactorio.

El servidor de *SWISS-MODEL* generó un modelo de MCT11 y utilizó como plantilla la estructura de un transportador de glicerol-3-fosfato con código PDB 1PW4. El GMQE fue de 0.46 y el QMEAN de -8.09. Estos dos parámetros sirven para evaluar la calidad del modelo. GMQE (*Global Model Quality Estimation*) es una estimación de la calidad que combina las propiedades del alineamiento entre la secuencia de interés y de la plantilla y el método de búsqueda de la plantilla. El score de GMQE

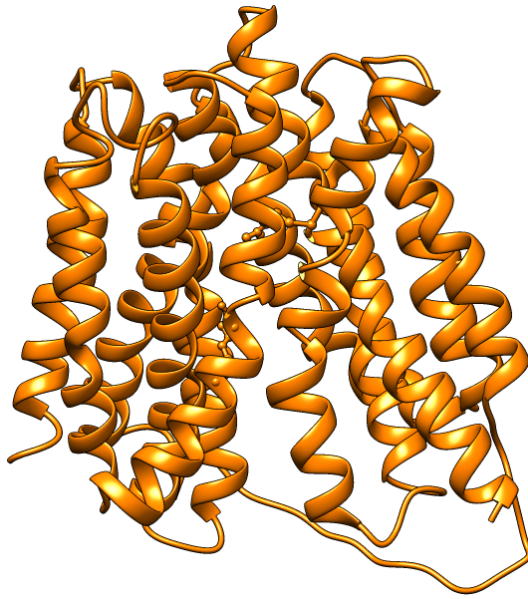


Figura 5.2: Modelo por homología de MCT11 generado con SWISS-MODEL. QMEAN -8.09

es expresado como un número entre 0 y 1 reflejando la precisión esperada de un modelo construido con el alineamiento. Un número más cercano a 1 indica mayor confiabilidad. Por otra parte el parámetro QMEAN Es un estimador compuesto basado en diferentes propiedades geométricas y proporciona estimaciones de calidad absoluta global (es decir, para toda la estructura) y local (por residuo) sobre la base de un solo modelo. Las puntuaciones de QMEAN cercanas a 0 indican una buena concordancia entre la estructura del modelo y las estructuras experimentales de tamaño similar. Puntuaciones de -4.0 o inferiores son indicación de un modelo de baja calidad.

El modelo que se generó con esta plataforma se ilustra en la figura 5.2, el cual en términos generales fue de mala calidad.

Modelo *de novo* con Robetta

El servidor de predicción de estructura *Robetta* (<http://robetta.bakerlab.org/>) intenta proporcionar el mejor modelo posible, mediante una combinación de protocolos basados en homología y protocolos *de novo*, es decir, regiones con homología detectable con alguna estructura del *PDB* se modelan con base en ella y los segmentos o dominios sin homología detectable se modelan con el protocolo *de novo* [69–71].

Al introducir la secuencia de aminoácidos del gen *SLC16A11* a la plataforma de *Robetta*, ésta generó cinco modelos basándose en la estructura del *PDB:3WDO*. Todos los modelos tenían el mismo *score* de 0.44, por lo que se eligió el primero.

Comparación de modelos

Se realizó un alineamiento estructural entre los tres modelos, es decir, el generado por *I-TASSER*, *SWISS-MODEL* y el generado por *Robetta*. Los tres modelos fueron muy similares estructuralmente ya que todos poseen 12 hélices α , sin embargo la composición y longitud de éstas no están dadas por los mismos aminoácidos. Las diferencias están mostradas en la figura 5.3). De manera similar en los tres modelos, el N-terminal y el C-terminal son regiones desordenadas que no poseen estructura. El RMSD del alineamiento estructural es de 1.153 Å, lo cual indica que no hay grandes diferencias estructurales entre los modelos (Figura 5.4). El RMSD (*Root Mean Square Deviation*) es un parámetro cuantitativo de la similitud entre dos o más estructuras de proteínas e indica la medida de la distancia promedio entre los átomos de las proteínas superpuestas.

Adicionalmente, la calidad de los tres modelos fue evaluada con el parámetro

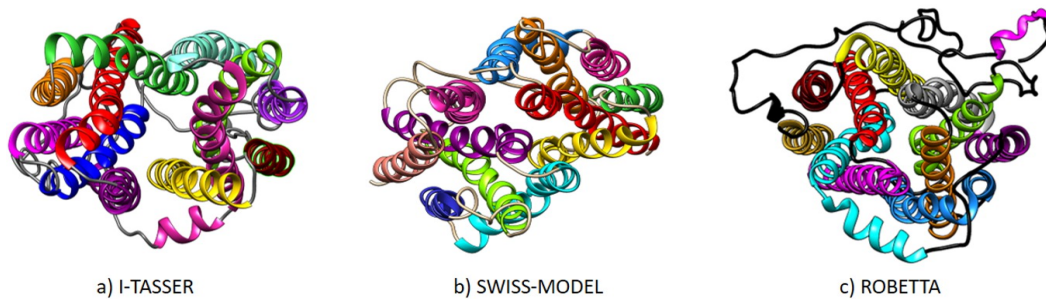


Figura 5.3: Hélices transmembranales de los tres modelos estructurales, cada una marcada con un color diferente.

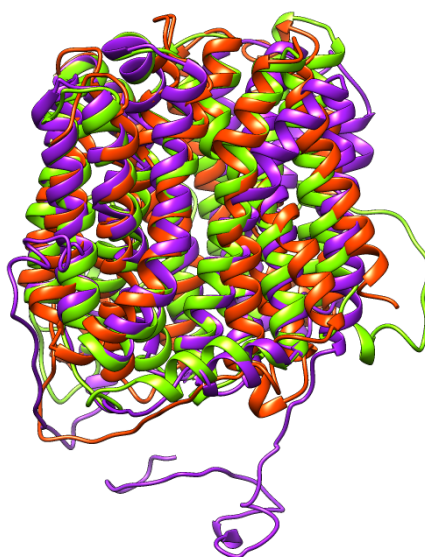


Figura 5.4: Alineamiento estructural de los tres modelos. (RMSD 1.153 Å). En morado el modelo generado con *I-TASSER*, en verde el modelo generado con *Robetta* y en naranja el modelo de *SWISS-MODEL*

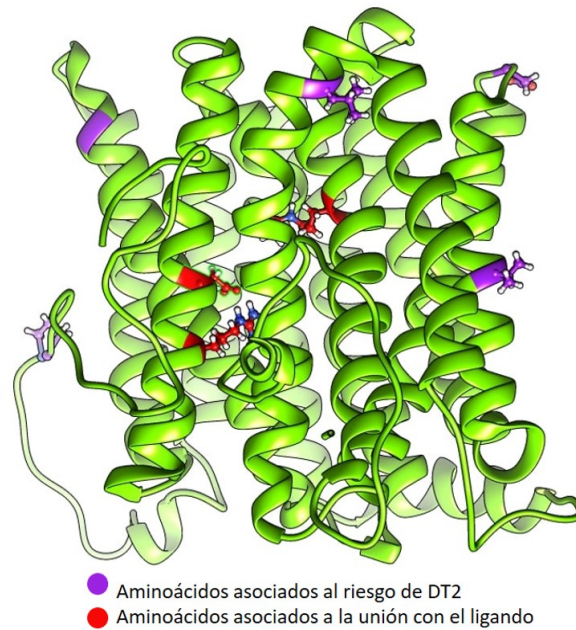


Figura 5.5: Modelo generado con *Robetta* con los aminoácidos resaltados que conforman el haplotipo de riesgo en morado y en rojo los aminoácidos asociados a la unión del ligando

QMEAN, descrito en la sección del modelado con *SWISS-MODEL*. Para el modelo de *I-TASSER* el QMEAN fue de -11.34, para el modelo generado con *SWISS-MODEL* el QMEAN fue de -8.06, y finalmente el QMEAN para el modelo hecho con *Robetta* fue de -2.57. De acuerdo a los criterios del parámetro QMEAN, el modelo construido con *Robetta*, fue el único de buena calidad, por lo que se utilizó para los análisis de acoplamiento molecular posteriores.

En la figura 5.5 se muestra el modelo generado con *Robetta*, en el que se resaltan los aminoácidos V113, D127, L187, G340 y P443, en color morado, los cuales conforman el haplotipo de riesgo a diabetes tipo 2. Los cinco aminoácidos están ubicados a la periferia de la proteína, ninguno dentro de la región del poro, lo cual sugiere que los SNPs posiblemente no afecten la unión de ligandos.

5.2. Simulaciones de acoplamiento molecular (*Molecular docking*)

La simulación de acoplamiento molecular (*Molecular Docking*) es una técnica computacional que tiene el propósito de predecir si una molécula pequeña en particular se unirá de manera estable a una proteína específica y cómo lo hará, por lo que este enfoque nos permite caracterizar el comportamiento de moléculas pequeñas en el sitio de unión de una proteína determinada así como elucidar procesos bioquímicos fundamentales, como la función [72].

El acoplamiento molecular consiste en dos pasos fundamentales: acoplar las moléculas en el sitio de unión de una proteína específica (identificación de la postura) y predecir con qué fuerza se una a la conformación acoplada a la proteína objetivo (puntuación o score) [72].

Con el objetivo de evaluar si MCT11 es capaz de unir otro tipo de ligandos además del piruvato, se utilizó el modelo estructural de MCT11 construido con *Robetta* para analizar el acoplamiento de los cinco tipos de moléculas que pueden ser transportadas por los MCTs tipo I:

1. Lactato
2. Piruvato
3. Hormonas tiroideas (T2, T3, rT3, T4)
4. Cuerpos cetónicos
5. Aminoácidos hidrofóbicos

Todos los ligandos que se probaron (tabla 5.2) mostraron unirse en un probable sitio de la proteína MCT11 conformado por los aminoácidos R57, D290 y R294. La

identificación de las posturas se muestran en las figuras 5.6, 5.7, 5.8 y 5.9. La tabla 5.2 resume los ligandos utilizados y el *score* obtenido.

Las moléculas que de acuerdo con la simulación, tienen una mayor probabilidad de ser ligandos del transportador MCT11, son: Triyodotironina (T3) score -7.5 (Figura 5.6a), Tiroxina (T4) score -7.1 (figura 5.6b), Triptófano score -7.0 (Figura 5.7a), Tirosina score -6.6 (Figura 5.7b), Fenilalanina score -6.4 (Figura 5.8a). Por otra parte, las moléculas de acetoacetato score -4.5 (Figura 5.8b), lactato score -3.9 (Figura 5.9a) y piruvato score -3.8 (Figura 5.9b) mostraron unirse en un sitio diferente y con score más bajo que el resto de los ligandos. Estas simulaciones sugieren que MCT11 probablemente tenga más similitudes con los MCTs tipo II, es decir, los que facilitan el transporte de monocarboxilatos hidrofóbicos.

La mayoría de los scores en el acoplamiento molecular son valores de predicción de la energía libre de la unión de la proteína con el ligando, también conocida como afinidad (Kcal/mol) [72]. Sin embargo estos *scores* no están diseñados para ser predictores de afinidad precisos, sino para ayudar en la selección virtual, es decir, están diseñados para clasificar los compuestos acoplados para la adquisición posterior y pruebas experimentales de los mejores *scores*. [72].

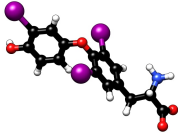
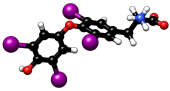
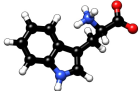
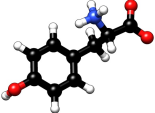

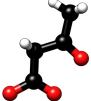
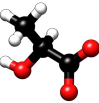

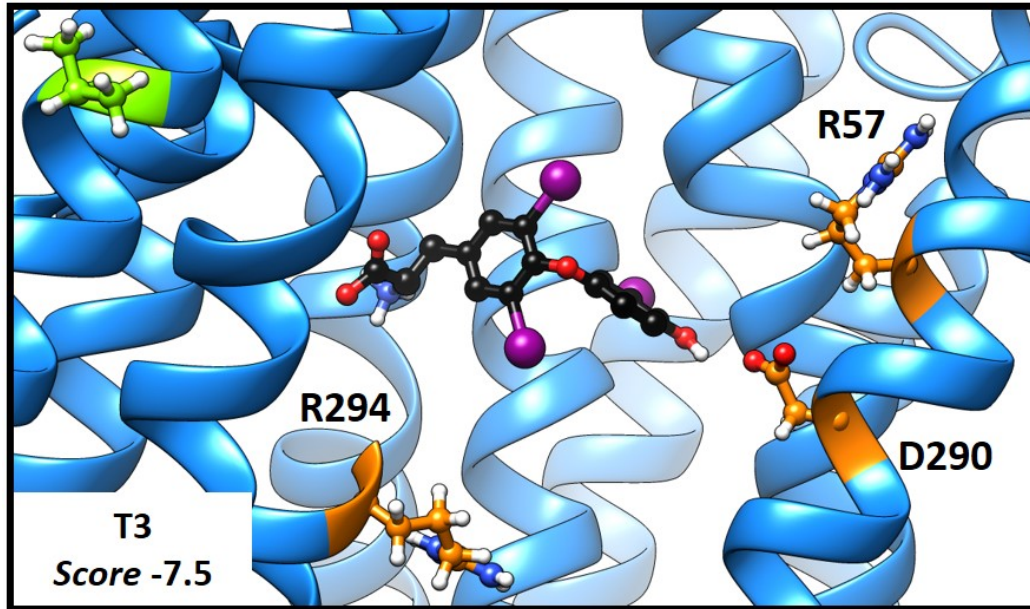
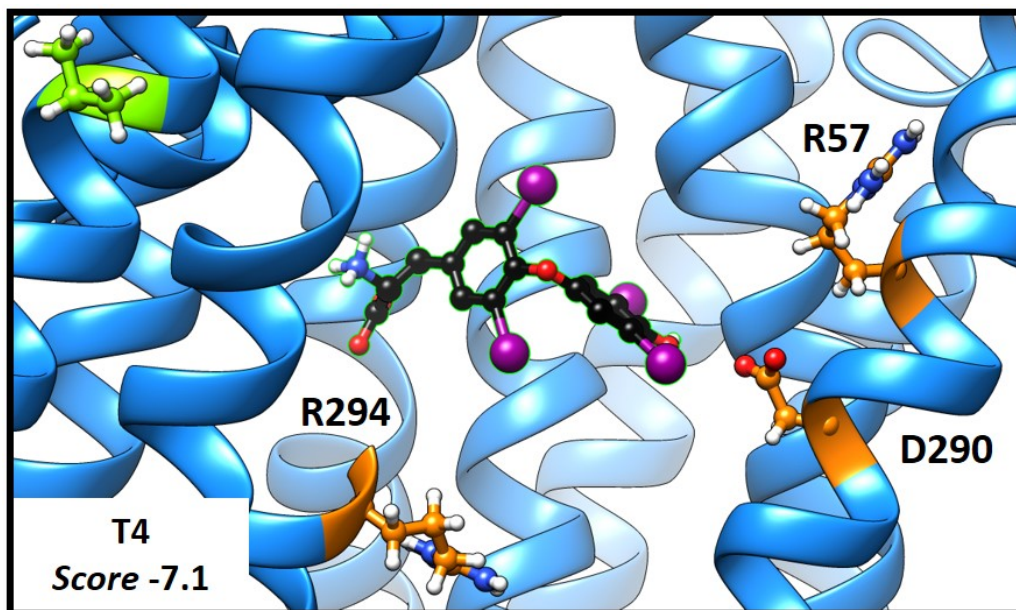
Molécula	Ligando	Score
	Triyodotironina (T3)	-7.5
	Tiroxina (T4)	-7.1
	Triptófano	-7.0
	Tirosina	-6.6
	Fenilalanina	-6.4
	Ácido acetoacético	-4.5
	Lactato	-3.9
	Piruvato	-3.8

Tabla 5.2: Ligandos y *Scores* obtenidos de la simulación de acoplamiento molecular.

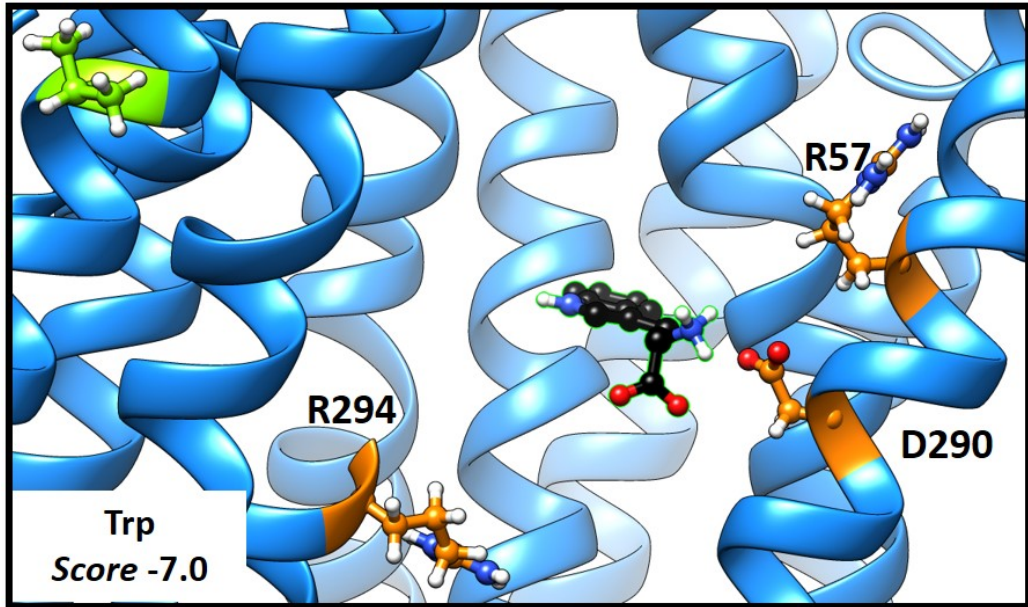


(a) Simulación de acoplamiento molecular con T3

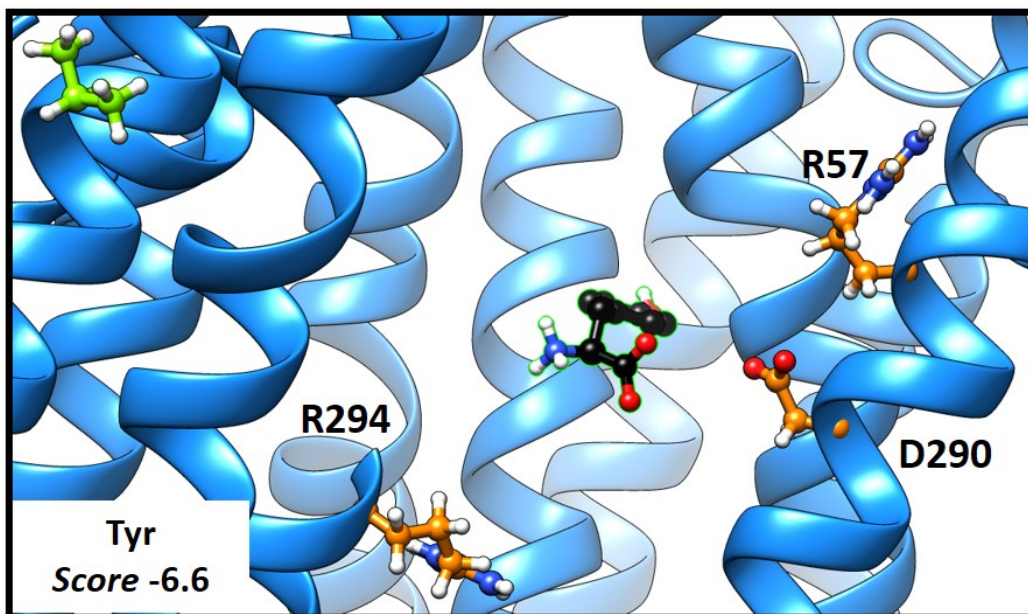


(b) Simulación de acoplamiento molecular con T4

Figura 5.6: Simulación de acoplamiento molecular con los dos ligandos con mayor score: T4 y T3. Los aminoácidos resaltados en naranja son residuos homólogos a los que participan en la unión con el ligando en el transportador MCT1.

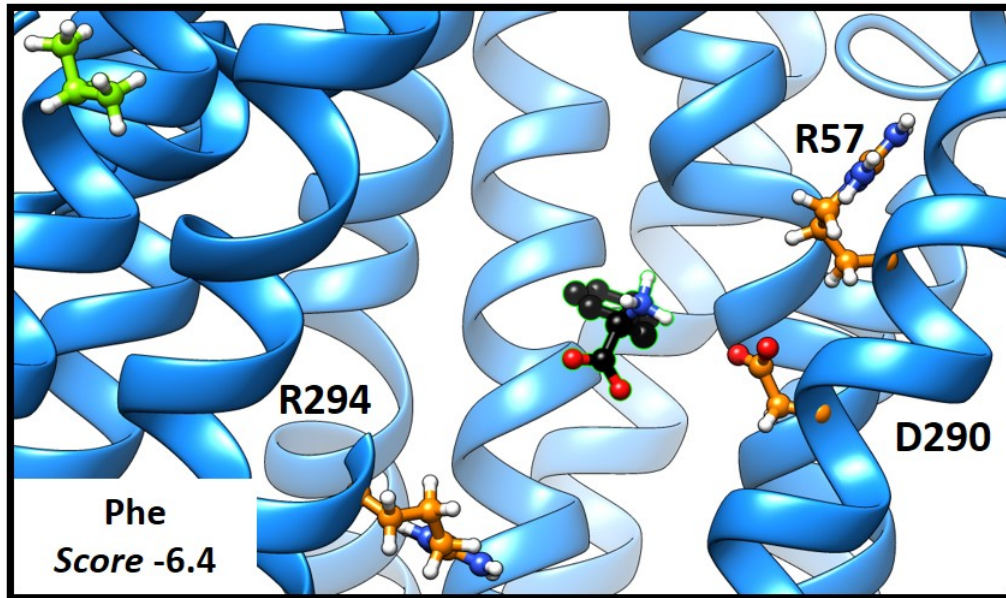


(a) Simulación de acoplamiento molecular con Triptófano

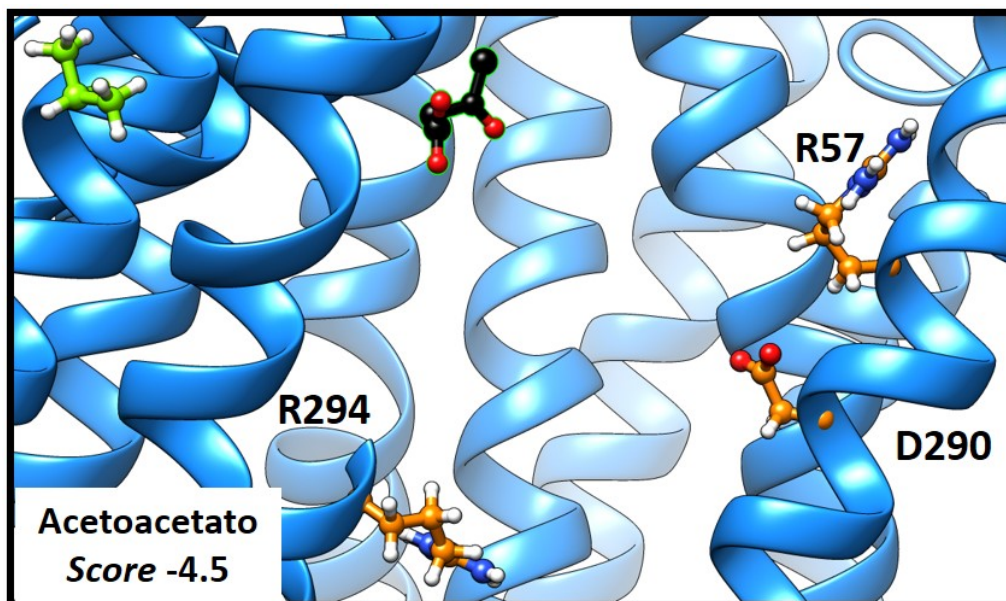


(b) Simulación de acoplamiento molecular con Tirosina

Figura 5.7: Simulación de acoplamiento molecular con triptófano, tirosina y fenilalanina. Los aminoácidos resaltados en naranja son residuos homólogos a los que participan en la unión con el ligando en el transportador MCT1.

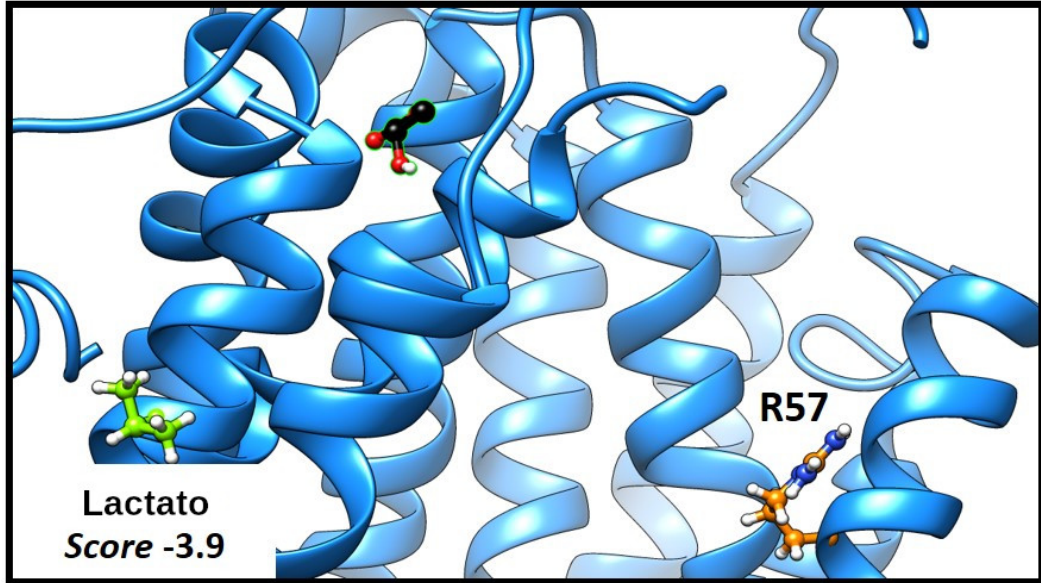


(a) Simulación de acoplamiento molecular con Fenilalanina

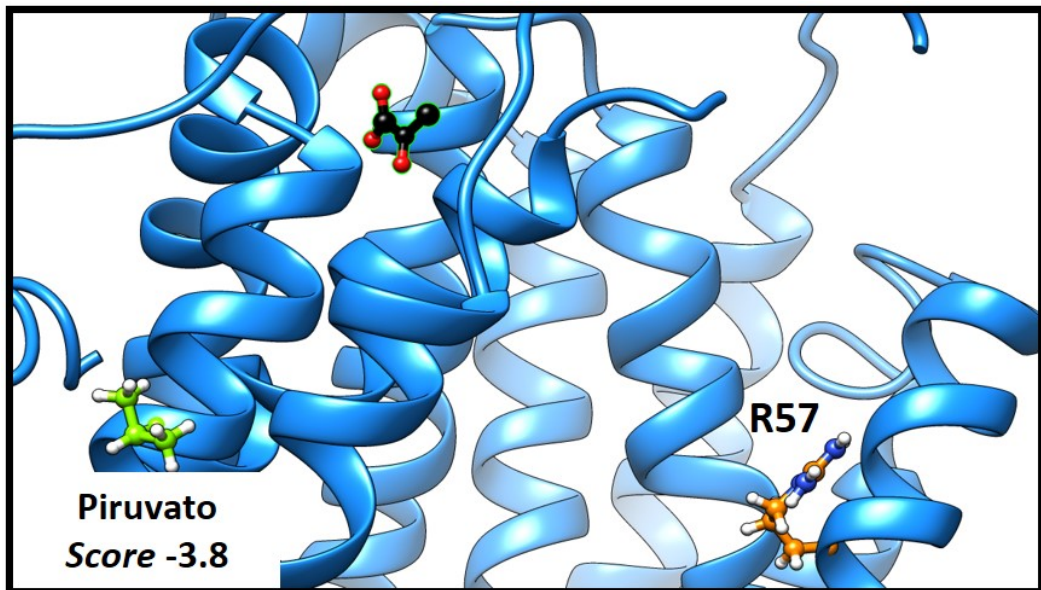


(b) Simulación de acoplamiento molecular con Acetoacetato

Figura 5.8: Simulación de acoplamiento molecular de Fenilalanina y Acetoacetato. Los aminoácidos resaltados en naranja son residuos homólogos a los que participan en la unión con el ligando en el transportador MCT1.



(a) Simulación de acoplamiento molecular con Lactato



(b) Simulación de acoplamiento molecular con Piruvato

Figura 5.9: Simulación de acoplamiento molecular de lactato y piruvato. El aminoácido resaltado en naranja corresponde a un residuo homólogo en MCT1 que está asociado con la unión del ligando. El residuo resaltado en verde corresponde a uno de los aminoácidos que conforman el haplotipo de riesgo en MCT11.

Comparación de los sitios de unión de MCT1 y MCT11

Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, en el artículo de Rusu y cols. [3] demostraron que MCT11 podía transportar piruvato. Sin embargo, en el artículo mencionan que aún no se ha probado una amplia gama de ligandos, por lo que sería sumamente interesante probar algún ligando que haya tenido un alto *score* en la simulación como T3, T4. Trp o Tyr, para poder evaluar la precisión del análisis bioinformático.

Se han descrito en varias publicaciones que en el sitio de unión de MCT1, el miembro más estudiado de la familia de transportadores de monocarboxilatos tipo I, existen tres residuos cargados en la región del poro (K38, D309 y R313), los cuales tienen roles clave específicos en la unión y el transporte de ligandos [41,42]. La lisina 38 está normalmente sin carga dentro del ambiente hidrofóbico del interior del poro, por lo que puede unir protones extracelulares, esto induce la conformación abierta en la cual la misma lisina 38 es capaz de unir lactato. Después de la unión, ambos ligandos (el protón H^+ y el lactato) son transferidos al par iónico conformado por el aspartato 309 y la arginina 313 localizado más profundo en el interior del poro.

En el artículo publicado por Rusu et al. [3], identificaron que en MCT11 existen residuos equivalentes y en posiciones homólogas a los descritos en MCT1 (Figura 5.10). Este fue otro criterio que utilizaron los autores para clasificar a MCT11 como tipo I. Los aminoácidos homólogos en MCT1 son: R57, D290 y R294.

A pesar de que todos los MCTs tipo I poseen estos tres residuos característicos de su sitio de unión y son capaces de transportar lactato y otros compuestos, su afinidad y selectividad por estos no son las mismas. Existen varios estudios publicados en los que se ha señalado que la fenilalanina en la posición 369 en MCT1 de origen humano (o F360 en MCT1 de rata), es el que regula la selectividad y afinidad del

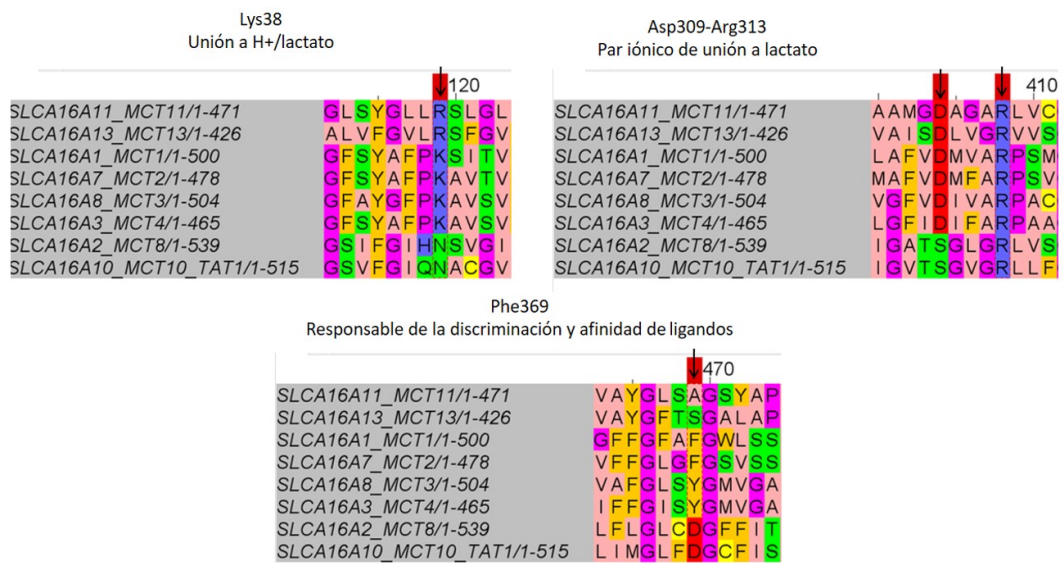


Figura 5.10: Alineamiento de los 6 MCTs con función conocida donde se señalan los aminoácidos asociados a la unión del ligando para los miembros tipo I y a su selectividad.

transportador [73, 74]. En la figura 5.10, es interesante notar que solo MCT2 posee una fenilalanina al igual que MCT1 en esa posición, y que en MCT3 y MCT4 se encuentra una tirosina. A esta pequeña variación se le ha atribuido la diferencia en las afinidades observadas entre estos cuatro miembros. Por ejemplo, la afinidad de MCT1 y MCT2 por el lactato es alta (km 1-3 mM), mientras que para MCT3 y MCT4 la km por el lactato es aproximadamente 30 mM [73, 74].

Ahora al analizar la secuencia de MCT11 (Figura 5.10), es posible apreciar que este transportador tiene una alanina (A353) en esa posición. Este cambio sugiere que el sustrato preferencial y la afinidad de MCT11 podría ser diferente de los otros miembros clase I.

Si se utiliza el modelo de MCT11 generado por *Robetta* y el modelo estructural de MCT1 generado por Wilson y cols. [43], para evaluar las diferencias de los sitios de unión de los dos transportadores, es posible apreciar con más claridad las implicaciones del cambio de aminoácido en la posición asociada a la selectividad.

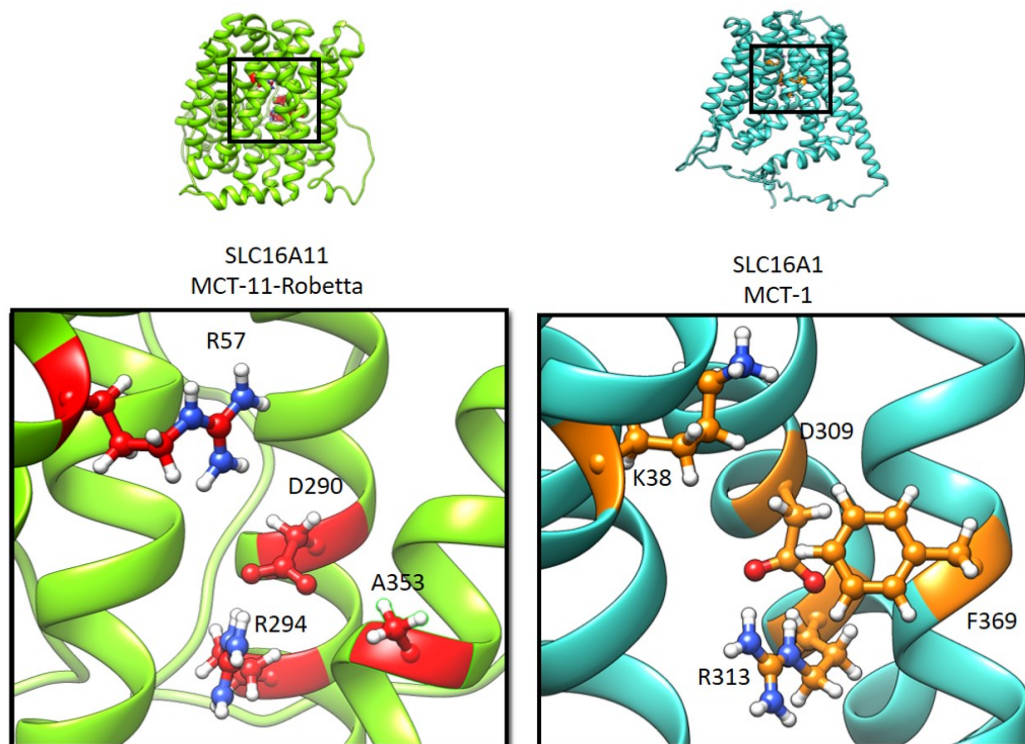


Figura 5.11: Aminoácidos asociados a la unión y selectividad de ligandos en MCT1 (turquesa) y en MCT11 (verde).

En la figura 5.11, podemos identificar los sitios de unión de ambos transportadores, en los que resaltan los tres residuos cargados asociados a la unión del ligando y la fenilalanina (para MCT1) o la alanina (para MCT11). En MCT1 es posible apreciar que el espacio que ocupa la fenilalanina 369 en la región del poro es grande, por lo que solo moléculas pequeñas podrían estar cruzando al otro lado del transportador. Por su parte, la alanina 353 en MCT11 es un residuo mucho menos voluminoso comparado con la alanina, por lo que MCT11 podría estar permitiendo el paso de moléculas más grandes. Esta observación coincide con los resultados obtenidos con la simulación de acoplamiento molecular, en la que los scores indicaron que la probabilidad de unión de moléculas más grandes (por ejemplo, hormonas tiroideas, aminoácidos aromáticos) era mayor.

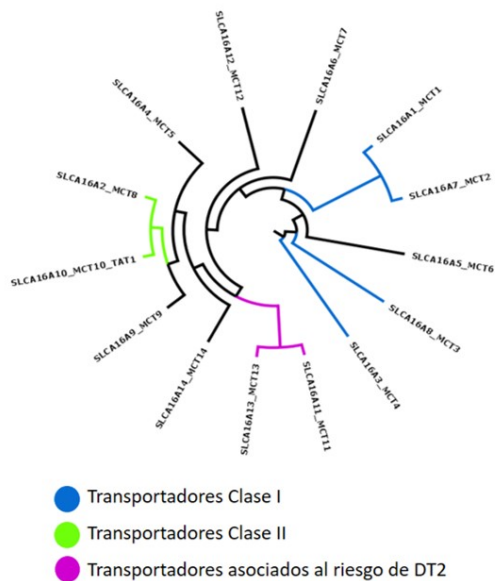
Al visualizar estos aminoácidos espacialmente en la estructura de los modelos de

MCT11 y MCT1 (Tomado del material suplementario de [43]), estos coinciden de una manera equivalente en la región del poro. En MCT1 resulta evidente que el espacio ocupado por la fenilalanina en la posición 369 realmente podría estar actuando como filtro de selectividad, dado que es un aminoácido voluminoso, podría bloquear una gran parte del poro y dejar pasar solo moléculas pequeñas (Figura 5.11). Por otro lado, al ubicar la posición homóloga de F369 en MCT11, ya sea en el alineamiento de la figura 5.10 o en el modelo estructural de la figura 5.11, se encuentra una alanina. Este aminoácido es mucho menos voluminoso que la fenilalanina, por lo que el poro podría estar dejando pasar moléculas mucho más grandes.

5.3. Construcción de un árbol con herramientas filogenéticas

Una de las técnicas más poderosas para asignar función biológica a una secuencia de proteínas es la detección de secuencias homólogas con función conocida a través de una búsqueda de similitud de secuencias [75]. Para ello se utilizó una reconstrucción filogenética con el objetivo de indagar las relaciones evolutivas entre los miembros de la familia MCT utilizando secuencias de aminoácidos y con el método de inferencia de máxima verosimilitud. Este método intenta encontrar el árbol con la máxima verosimilitud de producir la variación observada en un conjunto de datos [75].

Para obtener las secuencias se realizó un alineamiento tipo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del genoma de humano *Homo sapiens sapiens* [58, 59], utilizando como secuencia semilla a la proteína MCT11. Se eligieron solo los 14 miembros de la familia de transportadores de monocarboxilatos de humano. El alineamiento se realizó en el programa *MAFFT* versión 7.1 [60, 61]. Posteriormente



Categoría	Miembro	Ligando	Mecanismo
I	SLC16A1 SLC16A3 SLC16A7	Piruvato, Lactato, Cuerpos cetónicos	Acoplado a H ⁺
	SLC16A8	Lactato	
	SLC16A2	T3, T4	
II	SLC16A10	Aminoácidos aromáticos	Difusión facilitada
	SLC16A11		
Sin clasificar	SLC16A6	β-hidroxibutirato	-
	SLC16A9	Carnitina	Difusión facilitada
	SLC16A4 SLC16A5 SLC16A11 SLC16A12 SLC16A13 SLC16A14		

Figura 5.12: Árbol construido con herramientas filogenéticas de la familia de transportadores de monocarboxilatos. Las ramas coloreadas representan a los miembros que tienen estudios funcionales y el sustrato que transportan es conocido. En verde los que transportan monocarboxilatos hidrofóbicos, en azul los que transportan lactato, piruvato y cuerpos cetónicos, en magenta los genes *SLC16A11* y *SLC16A13* que no tienen función conocida pero son de interés biomédico.

se determinó el esquema de partición óptimo para el alineamiento usando el programa *Partition Finder 2* que corre sobre *Phyton* versión 2.7 [62]. El análisis filogenético se realizó asumiendo un modelo de sustitución *GTR + Γ* con el programa *RAxML* versión 8 [63]. El soporte de los clados o ramas del árbol fue evaluado con 1000 réplicas de *bootstrap*. El árbol generado se muestra en la figura 5.12.

El objetivo principal de reconstruir la genealogía de la familia SLC16A fue detectar posibles similitudes funcionales entre sus miembros. En el árbol que se muestra en la figura 5.12, los miembros tipo I están representados en azul, los tipo II en verde y MCT11 y MCT13 en magenta. En el árbol es posible apreciar que MCT11 y MCT13 están agrupados juntos y se localizan más cercanos cercanos al clado que agrupa a los transportadores de monocarboxilatos hidrofóbicos que a los miembros del tipo I. Este resultado sugiere que MCT11 podría tener más características en común con

los miembros del tipo II. Además este resultado coincide con lo obtenido en las simulaciones de acoplamiento molecular, donde las moléculas que presentan una mayor afinidad son las hormonas tiroideas y los aminoácidos hidrofóbicos.

A pesar de que los estudios de los miembros de esta familia son limitados, estudios recientes han demostrado que SLC16A6 transporta cuerpos cetónicos mediante un mecanismo acoplado a protones, lo que lo clasificaría como de categoría I [41]. En el árbol mostrado en la figura 5.12, SLC16A6 se encuentra muy cercano a los miembros del tipo I. Adicionalmente, otro trabajo encontró que SLC16A9 transporta carnitina mediante un mecanismo independiente de protones [76], por lo que este miembro se clasificaría en la categoría II. En el árbol generado, SLC16A9 se encuentra agrupado junto con los miembros de la clase II. Estas evidencias sugieren que este árbol podría ser una herramienta útil para clasificar a los miembros de la familia sin estudios funcionales.

5.4. Caracterización bioquímica de MCT11 endógeno de muestras de hígado

Uno de los principales objetivos del proyecto era trabajar con muestras de hígado de humano, por lo que para este propósito era necesario identificar MCT11 endógeno de estas muestras. En todos los trabajos publicados hasta el momento, solo se ha trabajado con MCT11 recombinante, por lo que es de mucho interés poder caracterizar MCT11 en un contexto más fisiológico.

Se eligieron dos líneas celulares hepáticas, HepG2 y Clone 9, las cuales corresponden a humano y a rata respectivamente, como controles *in vitro* y también se utilizaron extractos de hígado de humano y rata.

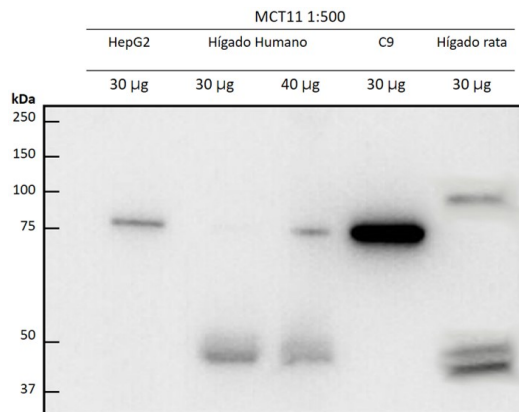


Figura 5.13: Inmuno-réplica tipo *Western blot* donde se marca MCT11 en diferentes extractos proteicos: HepG2 (75 kDa) , hígado humano (50 y 75 kDa), C9 (75 kDa) e hígado de rata (50 y 100 kDa).

Se realizó una inmuno-réplica tipo *Western blot* de estas cuatro muestras utilizando un anticuerpo monoclonal contra MCT11 (Santa Cruz Biotechnology) para identificar la proteína. En la figura 5.13, es posible apreciar que para las muestras de humano, es decir, en HepG2 encontramos una banda de 75 kDa, en extracto de hígado de humano dos bandas, una en 50 kDa y otra en 75 kDa. Para las muestras de rata, encontramos que en C9 existe una banda de 75 kDa mientras que en extracto de hígado de rata encontramos tres bandas: Una doble banda en 50 kDa y otra banda en 125 kDa. Tomando en cuenta que el peso molecular calculado para MCT11 es 48 kDa, el resultado esperado era encontrar una sola banda en cada una de las muestras en aproximadamente 50 kDa, pero dadas las diferencias observadas, nos interesamos en identificar la naturaleza de las bandas pesadas en extractos de hígado de rata y humano.

Las diferencias observadas en los pesos moleculares pueden ser ocasionadas por diversas razones. Una posibilidad es que el anticuerpo anti-MCT11 esté marcando diferentes isoformas de la proteína MCT11, para la cual, las herramientas bioinformáticas predicen dos formas extra además de la canónica (Identificador de entrada Q8NCK7 de UniProt), una forma de 439 aminoácidos (Identificador de

entrada C9JRM8 de UniProt) y otra más corta de 93 aminoácidos (Identificador de entrada I3L431 de UniProt), sin embargo los pesos calculados para estas dos isoformas son 44.27 kDa y 3.24 kDa respectivamente, y no coinciden con las observadas en este trabajo. Otra posibilidad es que la proteína sufra modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones o proteólisis que modifiquen el peso molecular de la proteína y que estas pudieran ocurrir en determinados contextos fisiológicos y por ello no se observen de igual manera en tejido que en línea celular. Otro aspecto que también debe ser tomado en cuenta era la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-MCT11.

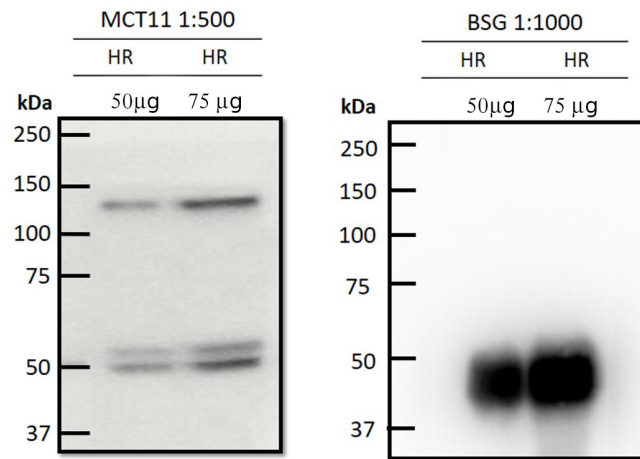
Al revisar la literatura al respecto de este tema, se encontró que las diferencias en los pesos moleculares es un tópico frecuente entre los miembros de la familia de transportadores de monocarboxilatos y que ha sido ampliamente discutido en numerosos artículos del grupo de Halstrap, de los cuales particularmente se destacan los artículos de Wilson y cols. del 2009 [43] y en el de Poole *et al.* de 1997 [77]. En estas publicaciones detallan la detección de tres diferentes bandas reconocidas por diferentes anticuerpos para MCT1 tanto en eritrocitos de rata como en ovocitos de *Xenopus sp.*: 120 kDa, 85 kDa y 44 kDa. Wilson y Poole asocian la marca en 120 kDa a un heterodímero, el cual es producto de un entrecruzamiento entre MCT1 y BSG producido por la adición de un inhibidor competitivo de MCT1, 4,4'-dibenzanidostilbeno-2,2'-disulfonato (DIDS) mediante un proceso que involucra la interacción del sitio de unión de MCT1 con DIDS y con BSG. Por otra parte, la banda de 85 kDa la asocian con la dimerización de MCT1 en un medio con detergente. Este fenómeno de agregación es frecuente en proteínas de membrana y es inducido durante la extracción de las proteínas de una muestra al solubilizarlas con detergentes y dejándolas en hielo por un periodo de tiempo variable [78, 79]. En estas dos publicaciones mencionan que la agregación de MCT1 es variable y difícil de controlar; sin embargo, en la publicación de Wilson *et al.* se proponen dos

factores que favorecen la dimerización de MCT1 recombinante: la sobreexpresión de MCT11 y la ausencia de BSG. Estos dos factores están íntimamente relacionados, ya que cuando se sobreexpresa MCT1 se supera la proporción de BSG necesaria para su correcto plegamiento, por lo que el transportador tenderá a dimerizar. Finalmente la banda identificada en 44 kDa es la que corresponde a MCT1 monomérica.

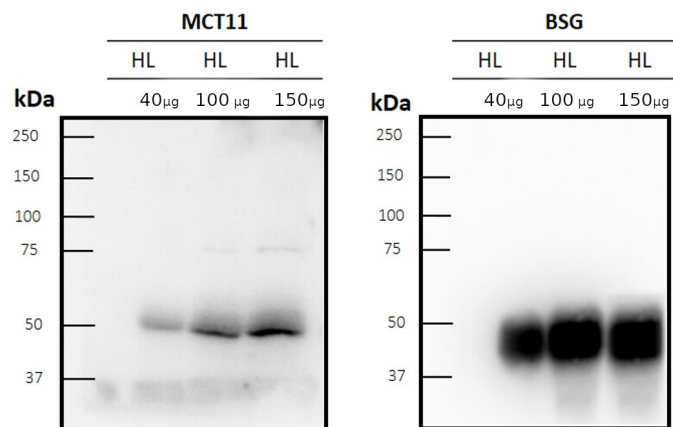
Dada esta evidencia, nuestros próximos experimentos fueron enfocados a elucidar si las bandas más pesadas (75 kDa en humano y 100 kDa en rata) correspondían a heterodímeros, agregados o a modificaciones post-traduccionales.

Para evaluar la hipótesis del heterodímero, se realizó una inmu-noréplica tipo *Western blot* de extractos de hígado de rata y humano marcando con dos anticuerpos monoclonales contra MCT11 y BSG. El resultado esperado era encontrar una banda en el mismo peso molecular para ambos anticuerpos en 125 kDa en el caso de las muestras de rata y en 75 kDa para las muestras de humano, pero no fue el caso. Para ambas muestras (figura 5.14), en las réplicas tipo *Western blot* reveladas contra BSG se encontró una banda muy gruesa de 50 kDa (igual al peso esperado de BSG, según la ficha técnica del anticuerpo) y en los revelados contra MCT11 se encontraron las tres bandas (doble banda en 50 kDa y otra en 125 kDa en la figura 5.14a) en las muestras de rata y las dos bandas (banda en 50 kDa y en 75 kDa, en la figura 5.14b) en muestras de hígado de humano. Estos resultados indican que las bandas de 125 kDa y 75 kDa en las muestras de rata y humano respectivamente, no corresponden a un producto producido por el entrecruzamiento de MCT11 con BSG.

El siguiente enfoque que se utilizó fue el de probar si estas bandas eran producto de la agregación de la proteína. Por lo que las muestras se sometieron a un agresivo tratamiento con el objetivo de inducir la desnaturalización total de las proteínas contenidas en las muestras. Para ello se utilizó urea 6 M para debilitar las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos y desnaturalizar las proteínas,



(a) Extracto de hígado de rata marcando MCT11 y BSG



(b) Extracto de hígado de humano marcando MCT11 y BSG

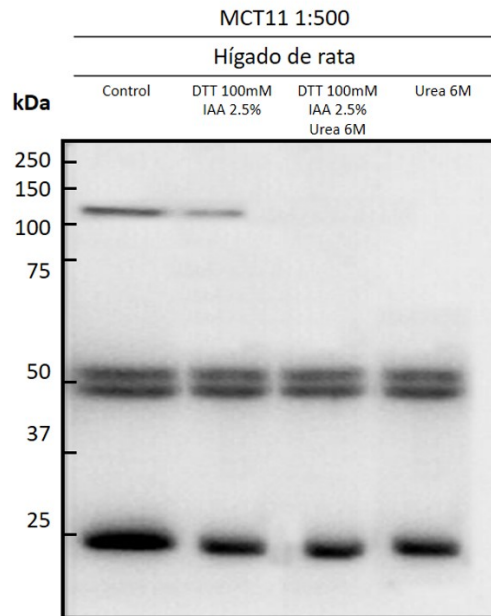
Figura 5.14: Inmuno-réplicas tipo *Western blot* que marcan la presencia de MCT11 y BSG en extractos de hígado de rata (panel a, HR) y humano (panel b, HH)

DTT (Ditiotreitol) 100 mM para reducir los puentes disulfuro en las proteínas y IAA (Yodoacetamida) 2.5 % para alquilar los grupos sulfidrilos (SH) y evitar re-oxidaciones. Luego de tratar las muestras con los agentes desnaturizantes, se evaluaron los posibles cambios ocurridos con una inmuno-réplica tipo *Western blot*, la cual se presenta en la figura 5.15. En la imagen, es posible observar que las muestras se presentan en cuatro diferentes condiciones: 1.Control, 2.DTT 100 mM, IAA 2.5 %, 3.Urea 6M, DTT 100 mM, IAA 2.5 % y 4.Urea 6M. En la figura 5.15a correspondiente a muestras de hígado de rata, es posible observar que la banda de 125 kDa desaparece luego de ser tratada con Urea 6M, por lo que esta banda corresponde a una agregación de la proteína MCT11 en hígado de rata.

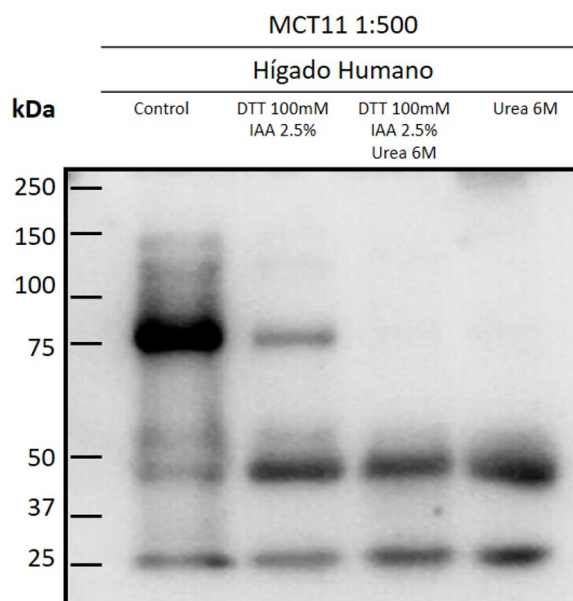
De manera similar, en la figura 5.15b, correspondiente a muestras de humano, es posible observar que en las dos condiciones con urea, la banda observada en 75 kDa desaparece, por lo que esta señal corresponde también a un agregado de MCT11 en muestras de hígado de humano.

Otro aspecto importante que es necesario mencionar, es que se encontró una banda de 25 kDa en todas las muestras que persistió a pesar del tratamiento desnaturizante (Figura 5.15). El hecho de encontrar esta banda de 25 kDa en las muestras podría representar un indicio de que el transportador MCT11 estuviera siendo procesado post-traduccionalmente de manera fisiológica, y esta modificación podría tener una implicación directa en su función en el hígado de humano y rata.

Dados los resultados obtenidos, era de mucho interés analizar la naturaleza de estas dos bandas (50 kDa y 25 kDa) mediante espectrometría de masas. Las dos bandas se aislaron a partir de la muestra de hígado de humano, utilizando una electroforesis dimensional de proteínas (2DE). Se realizaron dos geles gemelos con la misma muestra con el objetivo de utilizar un gel para teñirse con Coomassie coloidal y cortar las manchas elegidas y el otro para transferirlo en una membrana de nitrocelulosa para



(a)



(b)

Figura 5.15: Inmuno-réplicas tipo *Western blot* de muestras de hígado de rata (panel a) y humano (panel b) tratadas con cuatro condiciones diferentes: (primer carril) control, (segundo carril) DTT 100 mM e IAA 2.5 %, (tercer carril) Urea 6M, DTT 100 mM e IAA 2.5 %, (cuarto carril) Urea 6M.

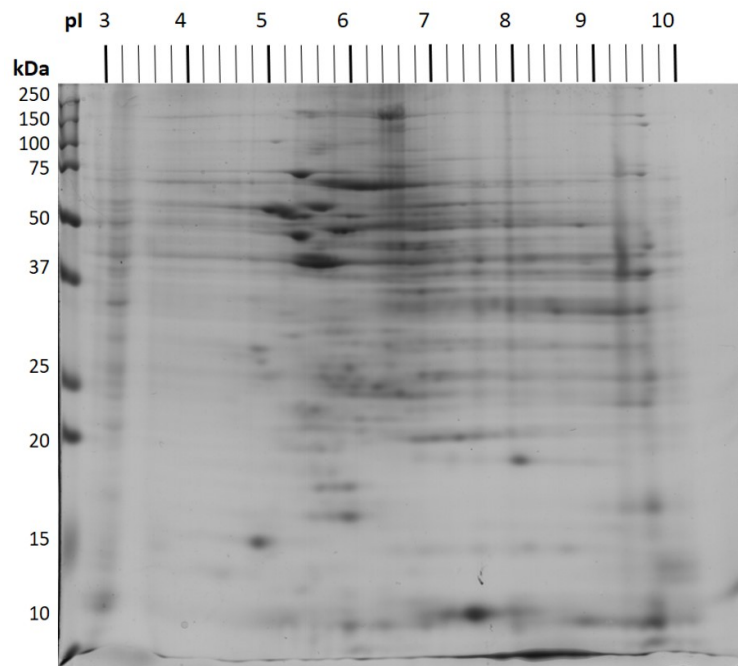
realizar una inmuno-réplica tipo *Western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal contra MCT11 e identificar las manchas asociadas a las proteínas de interés. El proteoma de la muestra de hígado de humano se muestra en la figura 5.16.

La inmuno-réplica tipo *Western blot* realizada y mostrada en la figura 5.16b, muestra en el peso de 50 kDa una específica e intensa mancha en el pH 5.2 aproximadamente aunque también se detectó una línea barrida que abarca desde el pH 6.2 al 8.8. En 25 kDa no hubo una mancha específica, sino una línea barrida desde el pH 5 hasta el pH 9.

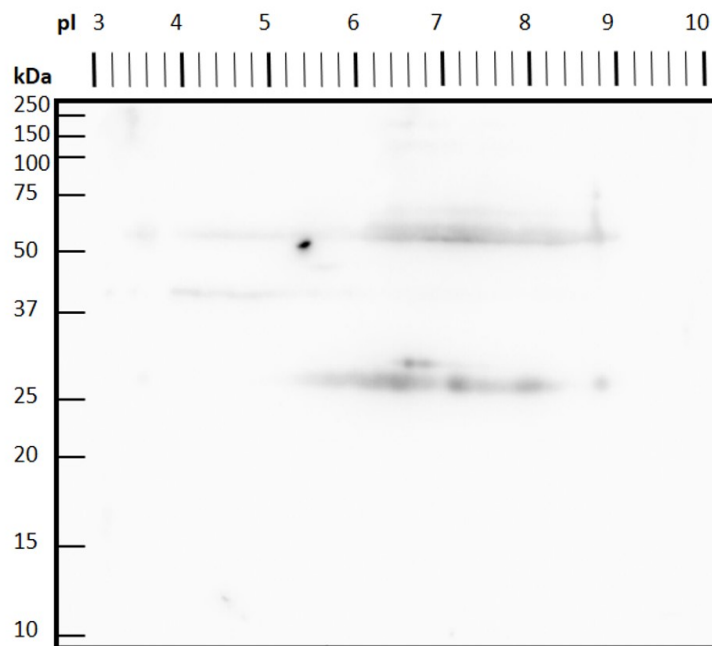
Estos resultados sugieren que la banda que identifica el anticuerpo monoclonal en 50 kDa probablemente se trate de MCT11 y que la banda observada en 25 kDa se trate de procesamiento inespecífico del transportador, ya que la marca en este peso no estuvo bien delimitada.

5.5. Transfecciones de la clona de cDNA del gen *SLC16A11* en HepG2 y en HEK293T

Con el objetivo de investigar el comportamiento electroforético de la proteína MCT11 recombinante, se eligió y adoptó un sistema modelo *in vitro* que pudiera en lo posible, simular el metabolismo fisiológico del hígado, en particular el referente a lípidos y ácidos grasos para poder realizar pruebas de localización subcelular de MCT11. Tomando en cuenta lo anterior, se eligió la línea celular de origen hepático HepG2 para realizar transfecciones transitorias con la clona de cDNA de MCT11 de humano. La línea HepG2 es derivada de un hepatoblastoma humano, y expresa muchas funciones específicas del hígado, particularmente aquellas relacionadas con el colesterol, triglicéridos y metabolismo de lípidos en general [80, 81]. HepG2 es



(a) Gel 2DE mostrando el proteoma de la muestra de hígado de humano teñido con azul de Coomassie coloidal



(b) Inmuno-réplica tipo *Western blot* del patrón electroforético de hígado de humano revelado con el anticuerpo monoclonal contra MCT11

Figura 5.16: Patrón electroforético en 2D de la muestra de hígado de humano teñido con Azul de Coomassie coloidal e inmunoréplica tipo *Western blot* marcando MCT11. El rango de los puntos isoléctricos de las proteínas es de 3 a 10

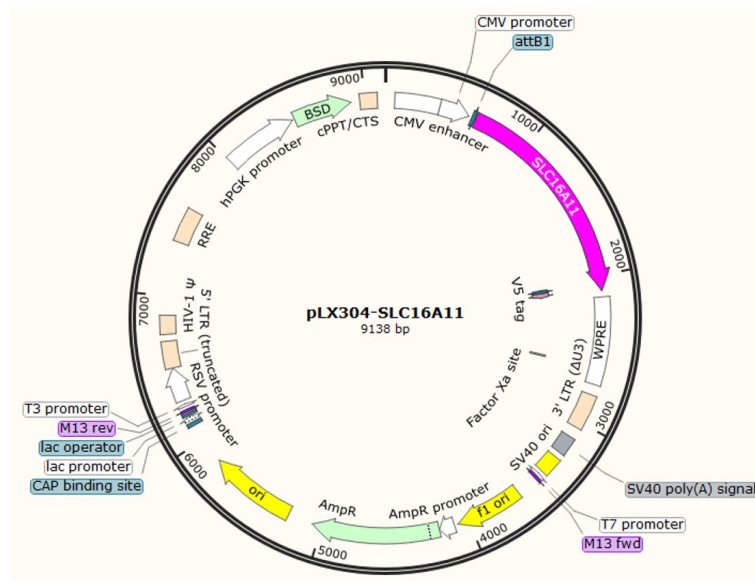


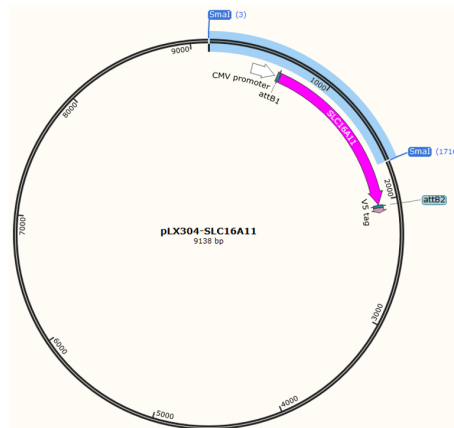
Figura 5.17: Plásmido lentiviral pLX304-SCL16A11

capaz de sintetizar y secretar colesterol, apolipoproteínas, y ácidos biliares, además de que realiza las rutas metabólicas de β -oxidación y β -oxidación peroxisomal que degrada ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) [80, 81]. Por lo tanto la línea celular HepG2 representa un útil modelo para la investigación de procesos metabólicos que involucren lípidos en hígado.

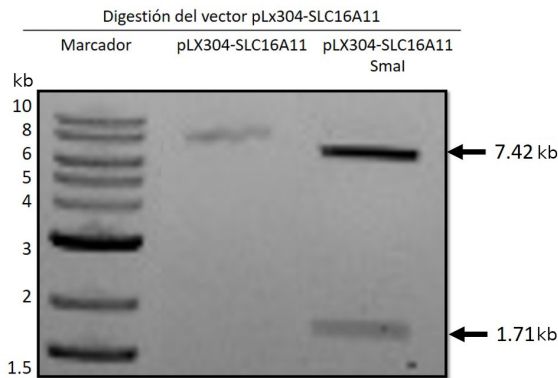
El plásmido pLX304-*SLC16A11*

Para las transfecciones transitorias se utilizó un plásmido lentiviral de tercera generación: pLX304 (*Addgene plasmid 25890*) [64]. Este plásmido contiene el cDNA de *SLC16A11* de origen humano bajo el promotor de citomegalovirus (CMV), además de una etiqueta V5 en el carboxilo-terminal, que permite identificar la proteína recombinante. El mapa del plásmido se muestra en la figura 5.17.

En primer lugar, fue necesario hacer controles para confirmar la identidad del plásmido pLX304 y que el gen de *SLC16A11* estuviera clonado dentro del vector. Para evaluar la identidad del plásmido, se realizó un ensayo de restricción con



(a) pLX304-SLC16A11 con sitios de corte para SmaI



(b) Fragmentos de pLX304-SLC16A11 después del corte con SmaI

Figura 5.18: pLX304-SLC16A11 digerido con la endonucleasa SmaI

la enzima de restricción SmaI, la cual tiene dos sitios de corte en el vector pLX304-SLC16A11: uno cercano al promotor de CMV y otro en el cDNA del gen SLC16A11 (figura 5.18a). Por lo que el corte del plásmido con esta enzima genera dos fragmentos de distinto peso molecular: uno de 7.42 kb y otro de 1.71 kb y valida que el vector utilizado es el pLX304 y que el gen de SLC16A11 está contenido en él.

La reacción de digestión se corrió en un gel de agarosa y se muestra en la figura 5.18b, donde es posible apreciar los dos fragmentos del tamaño esperado, por lo que se ratificó la identidad del plásmido y el gen.

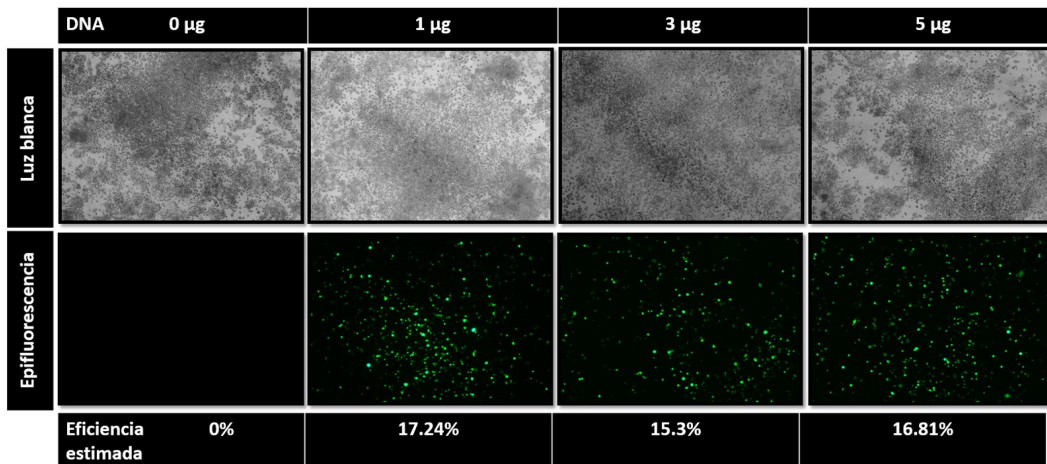


Figura 5.19: Células HepG2 cotransfectadas con pLX304-*SLC16A11* y pReceiver en diferentes condiciones.

Transfecciones en HepG2

Para encontrar la mejor condición de transfección se utilizaron 3 concentraciones de plásmido pLX304-SLC16A11: 1 μg , 3 μg , 5 μg . Para evaluar de manera inmediata pero indirecta la eficiencia de transfección, se cotransfectó con el plásmido pReceiver-M03 (*GeneCopoeia*) el cual expresa la proteína verde fluorescente. Para las 5 condiciones descritas, la eficiencia estimada fue baja, menos del 20 % para la proteína GFP como se muestra en la figura 5.19.

Para evaluar la expresión de MCT11, se realizó una inmuno-réplica tipo *Western blot* de las condiciones anteriormente descritas, utilizando dos diferentes anticuerpos monoclonales, uno contra la proteína MCT11 y otro contra la etiqueta de V5 que adiciona el plásmido a la proteína recombinante. De esta manera es posible discernir qué proporción del total de la proteína es endógena y qué cantidad corresponde a la sobreexpresión de la proteína recombinante. La inmuno-réplica tipo *Western blot* en la cual se utilizó el anticuerpo contra MCT11 se muestra en la figura 5.20. En la imagen se aprecian bandas de aproximadamente 75 kDa en todas las condiciones, además no se encuentran diferencias en la intensidad de las bandas entre las diferentes

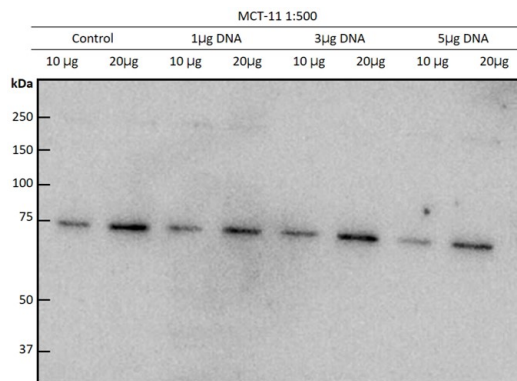


Figura 5.20: Inmuno-réplica tipo *Western blot* de extractos totales de HepG2 control y transfectadas utilizando el anticuerpo monoclonal contra MCT11

condiciones con respecto al control. Lo anterior indica que no hubo sobreexpresión de la proteína recombinante en el sistema, debido posiblemente a una baja eficiencia de transfección. Cabe mencionar que las bandas identificadas con el anticuerpo contra la proteína de 75 kDa, no corresponden al peso esperado de la proteína MCT11, ya que el peso calculado es de 47.79 kDa. Para la inmuno-réplica tipo *Western blot* en la que se utilizó el anticuerpo que marca la etiqueta V5 de la proteína MCT11 recombinante no generó ninguna señal detectable, confirmando entonces que no se produjo la sobreexpresión de la proteína recombinante.

La baja eficiencia de transfección pudo deberse a que no se puso cantidad de DNA suficiente, sin embargo, se probaron dos condiciones extra con mayor cantidad de plásmido, 10 y 20µg, y los resultados fueron iguales a los anteriormente descritos, y tampoco hubo señal con el anticuerpo V5. Otra posibilidad que podría explicar la baja eficiencia de transfección es la integridad del DNA utilizado, por lo que se corrieron muestras con el material utilizado en un gel de agarosa. El estado de los ácidos nucleicos se observó íntegro y en el peso esperado. Otra variable era que el plásmido tuviera mutaciones que pudieran ocasionar corrimientos en el marco de lectura y así evitar la expresión de MCT11. Para ello, se optó por secuenciar el plásmido y el producto codificado en él, para descartar cualquier mutación que pudiera afectar la

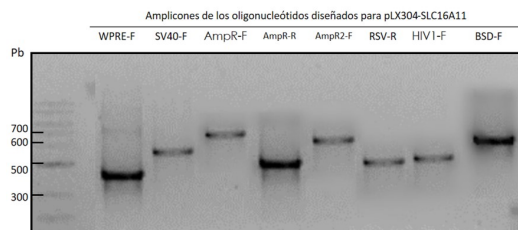


Figura 5.21: Gel de agarosa al 1 % donde se muestran los fragmentos amplificados por cada oligonucleótido diseñado.

expresión en el sistema. Con este fin se diseñaron 10 oligonucleótidos que permitieran secuenciar de manera completa el vector pLX304 y el cDNA de *SLC16A11* y se muestran en la tabla 4.1.

Dado que los oligonucleótidos fueron diseñados para este plásmido en particular, fue necesario encontrar su T_m experimental y verificar que amplificaran antes de mandarlos a la unidad de secuenciación. Los fragmentos amplificados de cada oligonucleótido se presentan en la figura 5.21.

Una vez que se encontraron las condiciones de amplificación de cada oligonucleótido, una muestra de $1\mu\text{g}$ de plásmido y 10 ng de oligonucleótido fue enviado a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación. Al comparar los resultados de la secuenciación con la secuencia esperada del plásmido no hubo ninguna diferencia, es decir, el plásmido no contenía ninguna variación en la secuencia. Otra variable que podría estar contribuyendo a la baja eficiencia de transfección era la línea celular. Por ello, se optó por utilizar línea celular HEK293T, la cual es un sistema flexible y fácil de transfectar. El cultivo de las células HEK293T se realizó de forma idéntica a lo descrito anteriormente para la línea HepG2. Al mismo tiempo, se evaluó el sistema utilizado para la transfección, ya que se compararon dos versiones de Lipofectamina: Lipofectamina 3000 (*Thermo Fisher Scientific*) y Lipofectamina LTX Reagent (*Thermo Fisher Scientific*). La diferencia principal entre ambos reactivos radica en los aditivos de sus composiciones, que el

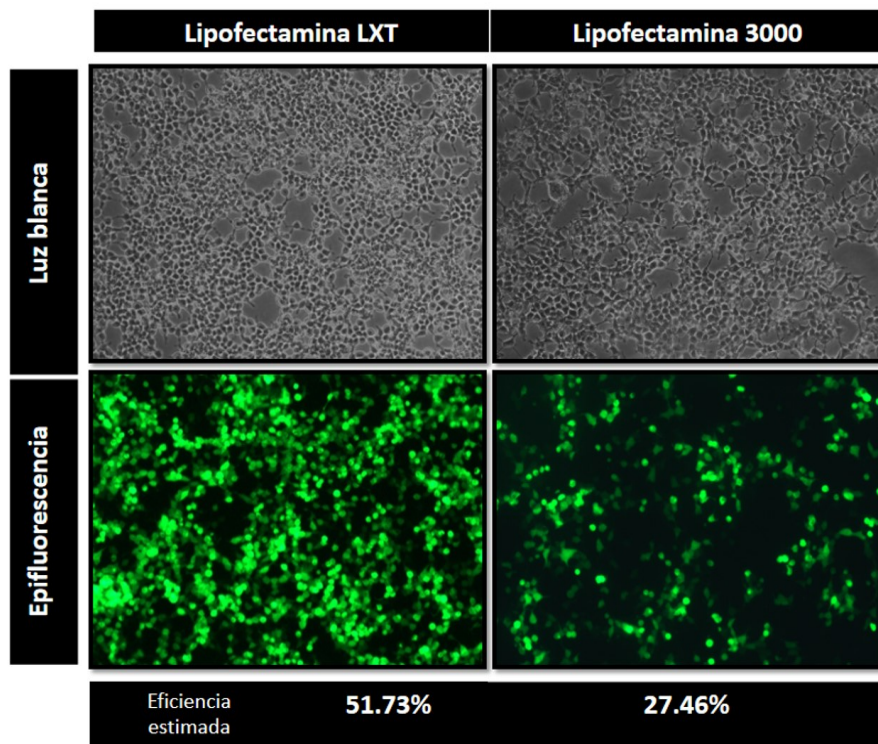


Figura 5.22: Transfecciones transitorias de células HEK293T con 1.25 μg de vector pReceiver-M03 , utilizando dos sistemas distintos: Lipofectamina LXT y Lipofectamina 3000

caso de la Lipofectamina 3000 hacen más eficiente y menos tóxicas las transfecciones para las células en comparación con Lipofectamina LXT Reagent de acuerdo con el fabricante (*Thermo Fisher Scientific*).

Se probaron 3 concentraciones diferentes de pLX304-SLC16A11 para cada sistema de transfección: 1.25 μg , 2.5 μg y 5 μg . Además se utilizaron dos pozos como control de transfección utilizando el plásmido pReceiver-M03 (1.25 μg) para evaluar de manera indirecta la eficiencia con cada sistema. En la figura 5.22, se muestra la evaluación de la transfección con el plásmido pReceiver-M03, cuya eficiencia se estimó en aproximadamente 51 % para el sistema Lipofectamina LXT Reagent, y de 27.4 % para el sistema Lipofectamina 3000. Por lo que para la línea celular HEK293T resultó ser más efectivo el sistema LXT Reagent como sistema de transfección.

Para evaluar la sobreexpresión de la proteína MCT11 en HEK293T se realizó un

lisado total de las células transfectadas, a los cuales se les cuantificó la concentración de proteína total por el método colorimétrico del BCA y se evaluó por inmuno-réplica tipo *Western blot*. En la figura 5.23 se muestra la sobreexpresión de la proteína MCT11 recombinante marcada con el anticuerpo anti-V5 a partir de células HEK293T transfectadas utilizando dos sistemas diferentes. Con la Lipofectamina LTX Reagent, en los carriles correspondientes a 1.25 μ g, 2.5 μ g de plásmido utilizado en la transfección, muestran una banda de aproximadamente 37 kDa, la cual es más intensa en la primera condición. Esto indica que hubo sobreexpresión de MCT11 recombinante, sin embargo, la banda de 37 kDa tampoco corresponde al peso esperado de la proteína recombinante, la cual tomando en cuenta la etiqueta de V5 tendría un peso aproximado de 50.2 kDa. Además, en los carriles correspondientes a las transfecciones con Lipofectamina LTX, se observan una serie de barridos de alto peso molecular que se espera sean artificios de la sobreexpresión de la proteína dado que la condición control no la presenta. En cuanto a las condiciones con Lipofectamina 3000 la eficiencia de sobreexpresión se reduce drásticamente, observándose una tenue banda de 37 kDa en la condición de 2.5 μ g, apoyando lo observado con la fluorescencia de la proteína GFP, para la línea celular HEK293T el sistema de transfección Lipofectamina LTX Reagent, es más eficiente.

Por otra parte, al utilizar el anticuerpo contra la proteína MCT11 para evaluar las mismas condiciones, la inmuno-réplica tipo *Western blot* no se detectó ninguna señal. De acuerdo con la ficha técnica del anticuerpo monoclonal anti-MCT11 *Santa Cruz biotechnology*, el anticuerpo está diseñado para marcar un segmento de 46 aminoácidos, del residuo 263 al 309. Al ubicar en el modelo generado por *Robetta* este segmento corresponde a una hélice transmembranal (figura 5.24), por lo que debería marcar también la proteína recombinante.

Tomando en cuenta que el anticuerpo contra V5 marca una banda en 37 kDa, un peso

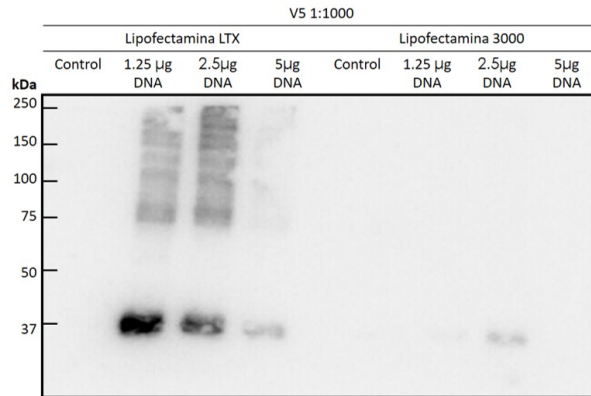


Figura 5.23: Inmuno-réplica tipo *Western blot* donde se muestra la sobreexpresión de la proteína MCT11 recombinante en células HEK93T transfectadas, marcada con el anticuerpo contra V5.

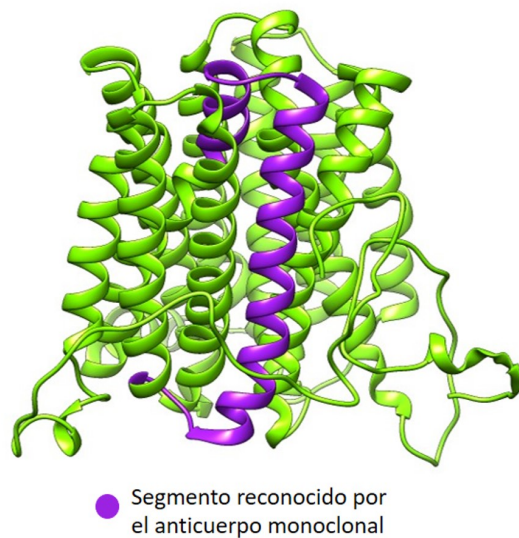


Figura 5.24: Modelo estructural generado con el servidor *Robetta*, en el que en verde se resaltan los 46 aminoácidos (263-309) reconocidos por el anticuerpo anti-MCT11 *Santa Cruz biotechnology*.

más bajo al esperado, y el anticuerpo contra MCT11 no detecta señal, es posible que la proteína esté siendo procesada, posiblemente proteolizada. Esta hipótesis del procesamiento de la proteína concuerda con lo observado en extractos de hígado de humano y rata, en el que es visible observar una banda de 25 kDa detectada por anticuerpo monoclonal contra MCT11.

Para evaluar si el anticuerpo monoclonal contra MCT11 era capaz de reconocer a la proteína MCT11 recombinante, se decidió hacer controles de sobreexpresión en bacterias *E. coli*, utilizando el mismo plásmido pLX304-SLC16A11. Esta estrategia elimina la variable del procesamiento postraduccional que podrían tener lugar en las células de mamífero utilizadas en las transfecciones. Los resultados se muestran en la figura 5.25. Particularmente en la inmuno-réplica tipo *Western blot* de la figura 5.25a, es posible apreciar que el anticuerpo anti-MCT11 no marcó ninguna banda en las muestras de bacterias que fueron transformadas con el plásmido vacío (carril empty) ni en el carril control de bacterias sin transformar, pero identificó dos bandas en las muestras de bacterias que fueron transformadas con el plásmido pLX304-SLC16A11 (carriles A11): una banda en 37 kDa y otra en 75kDa. . Tomando en cuenta los resultados anteriores, podemos afirmar que el anticuerpo monoclonal está reconociendo específicamente a la proteína MCT11. Sin embargo el peso de las bandas identificadas no corresponde al tamaño de MCT11. Con respecto a la banda de 75 kDa, es altamente probable que corresponda a agregación de MCT11 tal como se mostró en el caso de extractos de hígado de humano y rata; y que la banda de 37 kDa podría ser resultado de un evento de degradación de MCT11 en las bacterias *E. coli*.

Simultáneamente se realizó el mismo experimento pero marcando MCT11 con el anticuerpo monoclonal contra de la etiqueta de V5 que posee la proteína recombinante en el C-terminal. Este experimento se muestra en la figura 5.25b,

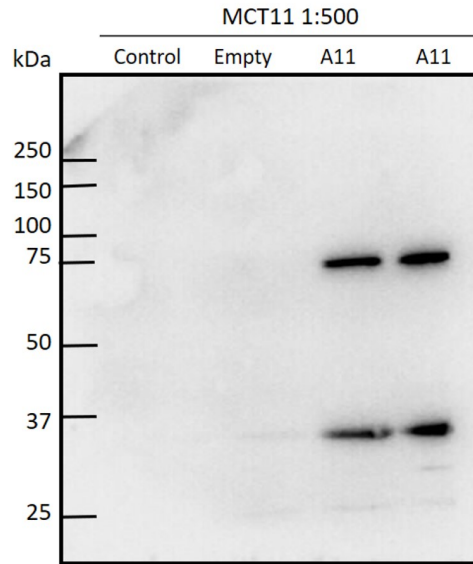
donde se aprecian dos bandas: una en 50 kDa y otra en 125 kDa. Estas bandas se aprecian en las bacterias transformadas con el plásmido (carriles a11) como se esperaba, sin embargo, bandas en el mismo peso molecular aparecen también, de manera más tenue, en una de las condiciones control (carril *empty*, figura 5.25b). Estos resultados parecen indicar que el anticuerpo anti-V5 marca una banda en 50 kDa tanto en las muestras de las bacterias que expresan MCT11 como en las que contienen el plásmido pLX304 vacío. Esta evidencia parece señalar que el anticuerpo anti-V5 no es tan eficiente para marcar MCT11 recombinante, ya que mostró señal positiva en controles negativos.

5.6. Distribución subcelular de MCT11

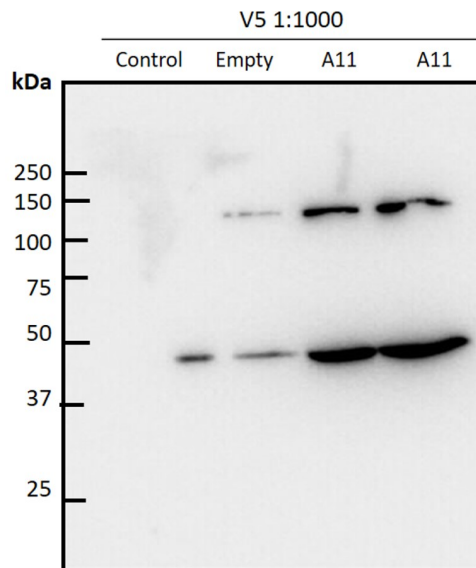
Uno de los principales propósitos de este trabajo fue la identificación de la distribución subcelular de MCT11. Para cumplir este objetivo, se usaron tres diferentes enfoques: inmunomarcaje con oro coloidal de MCT11 en muestras de hígado de rata y HepG2, aislamiento de mitocondrias de hígado de rata, e inmunohistoquímicas de cinco tejidos humanos relacionados con la fisiopatología de la DT2.

Localización *in situ* de la proteína MCT11 mediante la tinción de inmuno-oro coloidal

Se utilizó esta técnica para evaluar la expresión de MCT11 a nivel ultraestructural en células HepG2 y en pequeñas muestras de hígado de rata con el objetivo de identificar los subcompartimentos celulares donde se localiza MCT11. Se utilizó un anticuerpo monoclonal contra MCT11 (*Santa Cruz Biotechnology*) a una dilución de 1:300 y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a partículas de oro de 10 nm.



(a) Inmuno-réplica tipo *Western blot* de la expresión de MCT11 en *E. coli*, utilizando el anticuerpo contra MCT11



(b) Inmuno-réplica tipo *Western blot* de la expresión de MCT11 en *E. coli*, utilizando el anticuerpo contra V5

Figura 5.25: Inmuno-réplicas tipo *Western blot* de la proteína recombinante MCT11 provenientes de bacterias *E. coli* utilizando los anticuerpos contra MCT11 y V5.

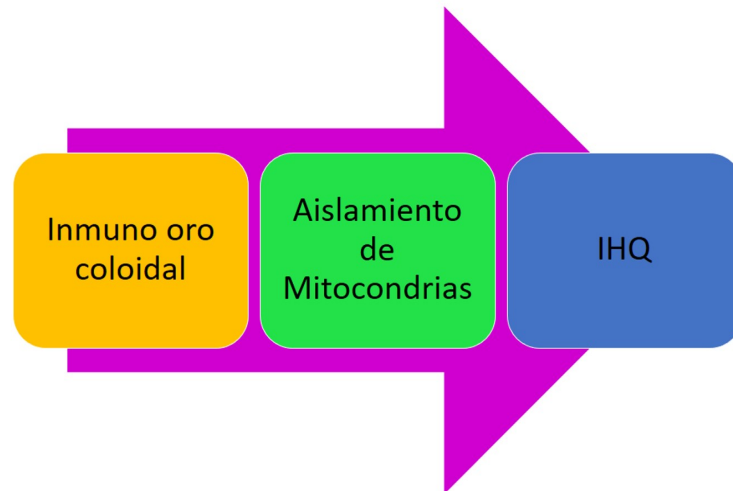


Figura 5.26: Los tres enfoques utilizados para la localización de MCT11

En las células HepG2, las partículas de oro coloidal fueron observadas en 5 diferentes organelos:

1. Membrana plasmática (PM)
2. Retículo endoplásmico (RE)
3. Mitocondria (M)
4. Núcleo (N)
5. Vacuolas lipídicas (LD)

En hepatocitos de rata, se observaron partículas de oro en 4 organelos:

1. Retículo endoplásmico (RE)
2. Mitocondria (M)
3. Núcleo (N)
4. Vacuolas lipídicas (LD)

En la figura 5.27, se observa un conjunto de partículas de oro sobre la membrana plasmática de las células HepG2. Lo cual sugiere que MCT11 está localizado en

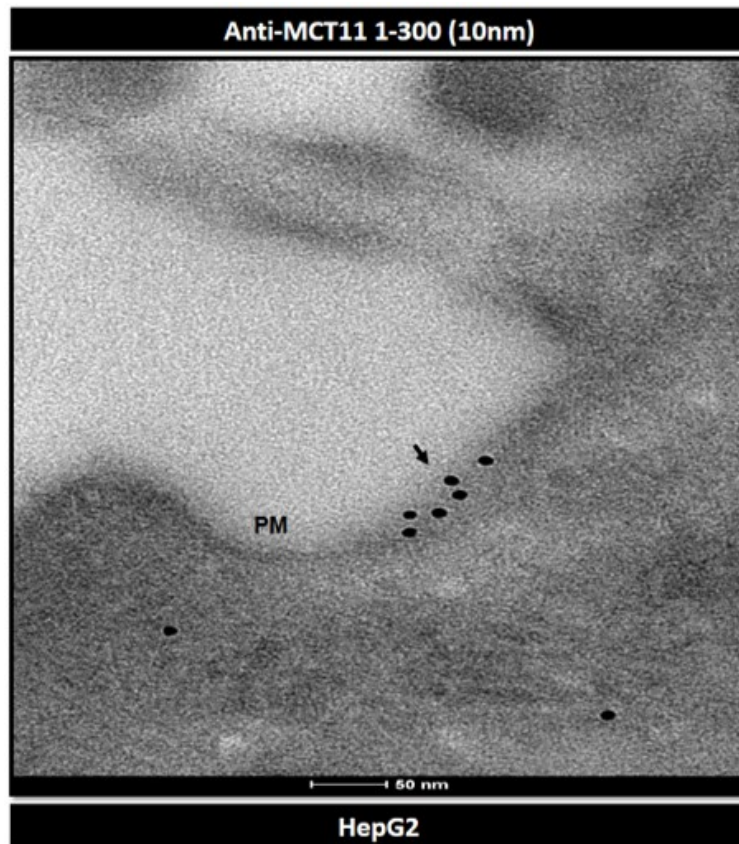
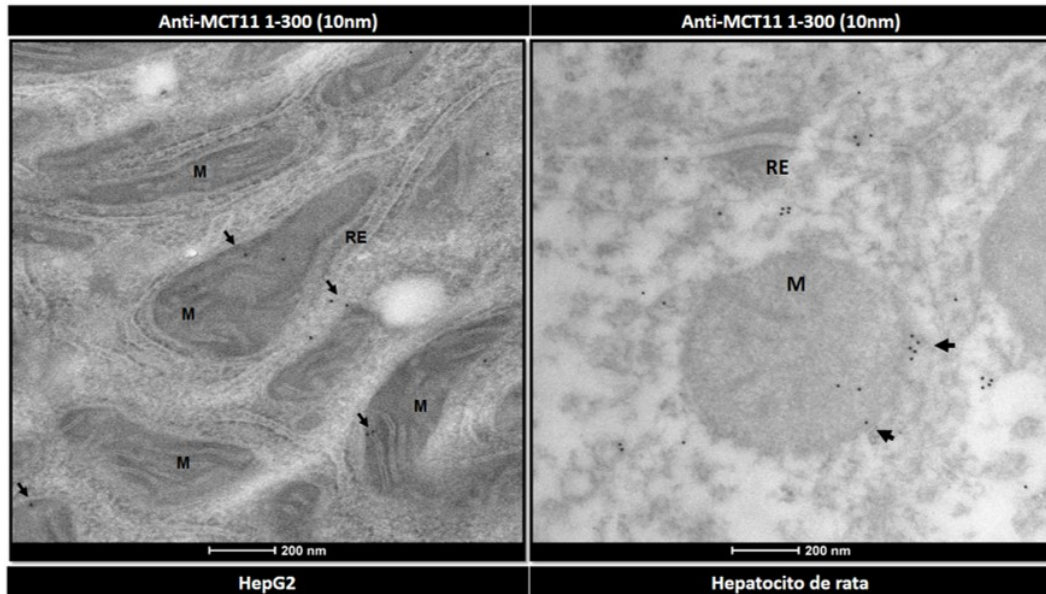


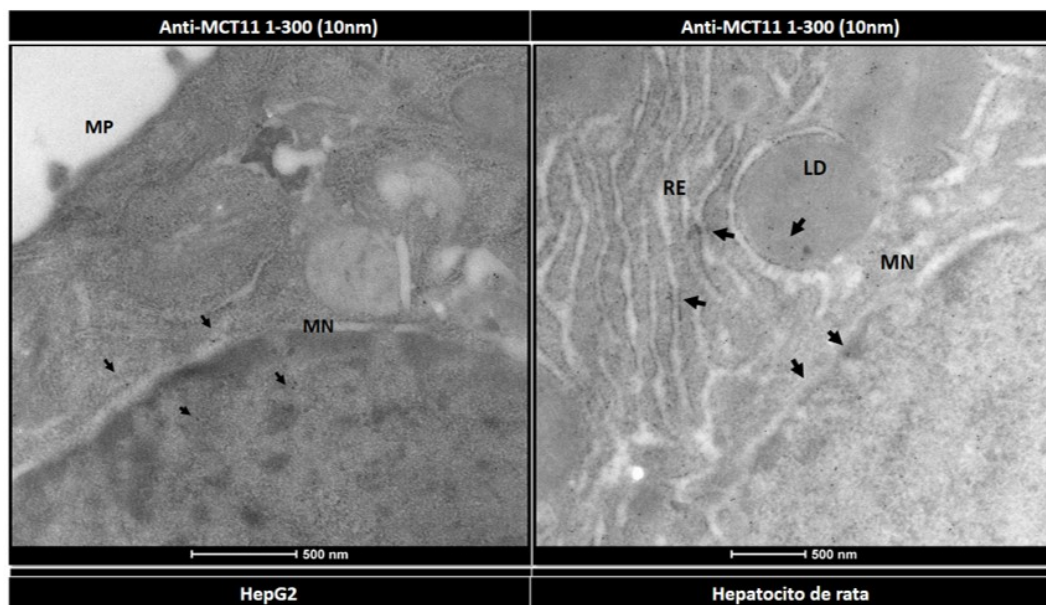
Figura 5.27: Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión de la distribución subcelular de MCT11 en células humanas HepG2. Las partículas de oro se observan en la membrana plasmática PM. Dilución 1-300.

esta estructura celular; sin embargo no fue posible observar la expresión de MCT11 en la membrana plasmática de hepatocitos de rata. En la figura 5.28a se muestra la marca coloidal sobre mitocondrias y retículo endoplásmico tanto en células HepG2 como en hepatocitos de rata. En las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de la figura 5.28b, es posible identificar que en hepatocitos de rata, las partículas de oro se encuentran adosadas a la membrana nuclear, el retículo endoplásmico y en vacuolas lipídicas, mientras que en la muestra de HepG2 es posible observar de manera similar marca en la membrana plasmática y en el interior del núcleo de la célula.

Se usó la marca con oro coloidal utilizado en este trabajo para identificar la



(a)



(b)

Figura 5.28: Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión de la distribución subcelular de MCT11 en células humanas HepG2 y en hepatocitos de rata. Las partículas de oro se observan en la membrana nuclear (MN), vacuolas lipídicas (LD), mitocondria (M) y retículo endoplásmico (RE). Dilución 1-300.

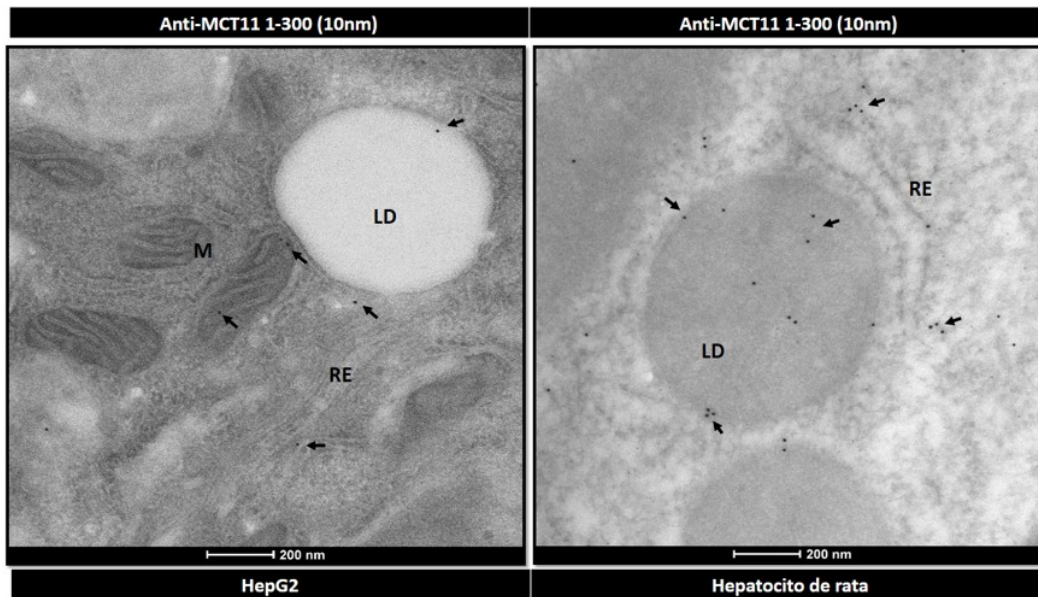


Figura 5.29: Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión de la distribución subcelular de MCT11 en células humanas HepG2 y en hepatocitos de rata. Las partículas de oro se observan en vacuolas lipídicas (LD), mitocondria (M) y retículo endoplásmico (RE). Dilución 1-300.

distribución intracelular de MCT11 en células hepáticas de humano y de rata. Los resultados que obtuvimos fueron muy similares para las dos muestras a excepción de que no fue posible identificar la presencia de MCT11 en membrana plasmática de hepatocitos de rata. Otro aspecto importante que vale la pena destacar, es que MCT11 fue encontrado en organelos que guardan una relación estrecha con el metabolismo de lípidos como el retículo endoplásmico, mitocondria y vacuolas lipídicas.

La evidencia de que MCT11 está localizado en distintas estructuras celulares debe ser tomada en cuenta para las futuras hipótesis y experimentos acerca de su función, ya que el único trabajo publicado hasta el momento de Rusu y cols. [3], que describe la posible asociación entre MCT11 y el riesgo a DT2, se enfoca únicamente en la proporción del transportador localizado en membrana plasmática [3].

Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata

Considerando los resultados obtenidos por inmuno-oro coloidal en el que se observó la expresión de MCT11 en mitocondrias y dado que es metodológicamente sencillo aislar este organelo a partir de tejido comparado con otros elementos celulares, se decidió utilizar hígados de ratas *Wistar* para obtener fracciones enriquecidas de mitocondrias.

El concentrado de mitocondrias se obtuvo a partir del hígado completo de un ejemplar macho adulto a través de centrifugaciones diferenciales. Para evaluar la pureza de la fracción mitocondrial, se utilizaron anticuerpos monoclonales contra proteínas marcadoras de cada compartimento subcelular: anti-lámina para evaluar la presencia de núcleo, anti-calnexina para retículo endoplásmico, anti-peroxina 16 para evaluar peroxisoma y anti-ATP5a para mitocondria. Las réplicas tipo *Western blot* se muestran en la figura 5.30, en la cual se observa que la fracción obtenida no tiene contaminación por núcleo ni retículo endoplásmico y solamente una pequeña proporción de peroxisomas, los cuales solo pueden ser separados a través de ultracentrifugación [82]. Al observar la réplica tipo *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-ATP5a, es posible percatarse de que la fracción está mayoritariamente conformada por mitocondrias.

Una vez que se obtuvo una fracción rica en mitocondrias, se evaluó si MCT11 se encontraba presente en ésta. La réplica tipo *Western blot* se muestra en la figura 5.31, en la cual es posible observar tres carriles: HR, Mit y Cit. Los cuales corresponden al extracto total de hígado de rata, extracto mitocondrial y al extracto citosólico respectivamente. En el carril HR es posible observar las tres bandas que se habían identificado en hígado de rata: una banda ligera de 25 kDa y una doble banda en 50 kDa, en el carril Cit se observan las mismas tres bandas, mientras que en el

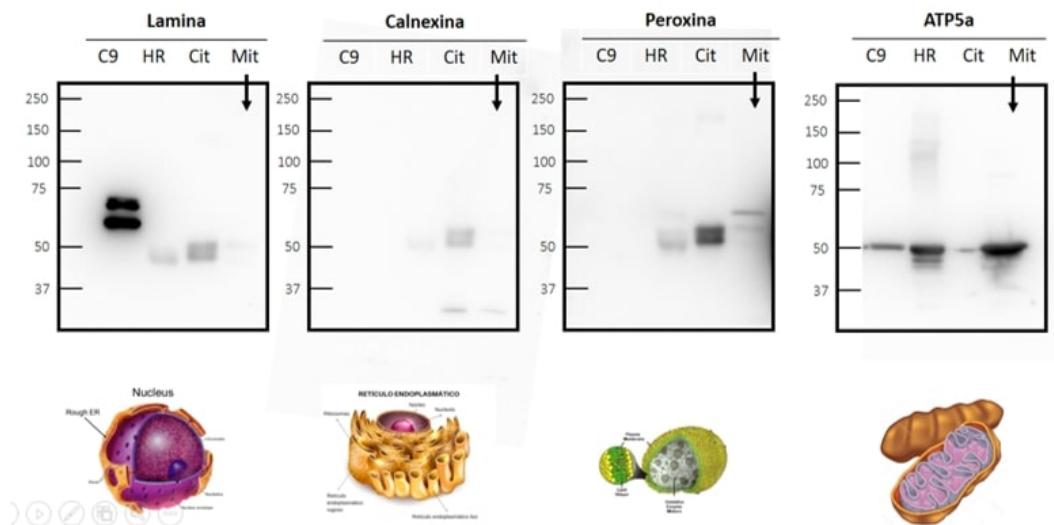


Figura 5.30: Inmuno-réplicas tipo *Western blot* donde se muestra la evaluación de la pureza de la fracción mitocondrial obtenida con diferentes marcadores celulares. C9: línea celular hepática de rata, HR: extracto total de hígado de rata, Cit: extracto citosólico de hígado de rata, Mit: extracto mitocondrial de hígado de rata.

carril Mit solo se aprecia una sola banda de 25 kDa. Estos resultados sugieren que una parte de la población de la forma corta de MCT11, posiblemente procesada pudiera estar teniendo una función en mitocondria, lo cual correspondería con las diferencias en los metabolitos relacionados con el metabolismo de lípidos en los trabajos previos [3, 25, 44, 45].

Evaluación de la expresión de MCT11 en diferentes tejidos humanos y su colocalización con diferentes organelos

Como se mencionó en los antecedentes, en el trabajo publicado por el consorcio SIGMA [25], identificaron que en hígado, glándula salival y tiroides son los tejidos de mayor expresión de *SLC16A11*. Sin embargo, esta evaluación se hizo a partir de cuantificación de mRNA, y no existía una evaluación de expresión a nivel de proteína publicado. Dado que era de mucho interés para los objetivos del presente proyecto, se evaluó la expresión de MCT11 cuatro diferentes tejidos relevantes en

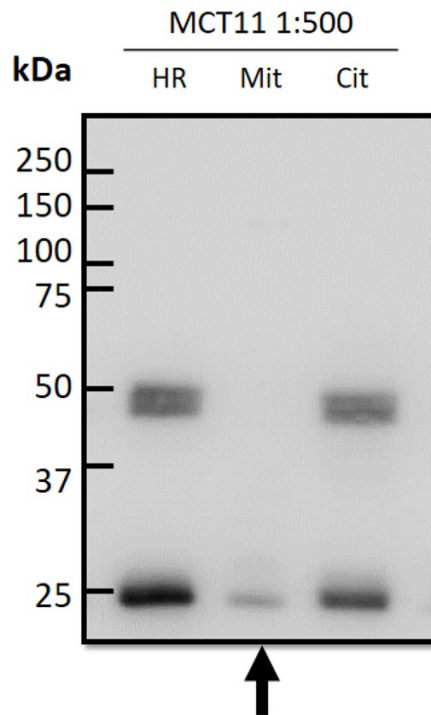


Figura 5.31: Expresión de MCT11 en mitocondrias

la fisiopatología de la DT2 además del hígado: páncreas, tiroides, tejido adiposo subcutáneo y tejido adiposo visceral.

Para estos fines, fue necesario hacer una colaboración con el departamento de patología del INCMNSZ, a partir de la cual pudimos tener acceso a un pequeña muestra (0.5 cm³) de los tejidos anteriormente mencionados. En total se colectaron estos cinco tejidos de dos diferentes autopsias de pacientes femeninas sin DT2 o afecciones metabólicas diagnosticadas. La mitad de cada muestra se fijó en formol y se procesó para su inclusión en parafina y análisis con inmunohistoquímica, mientras que la otra mitad se congeló para realizar una réplica tipo *Western blot* para evaluar la expresión de MCT11 en el tejido.

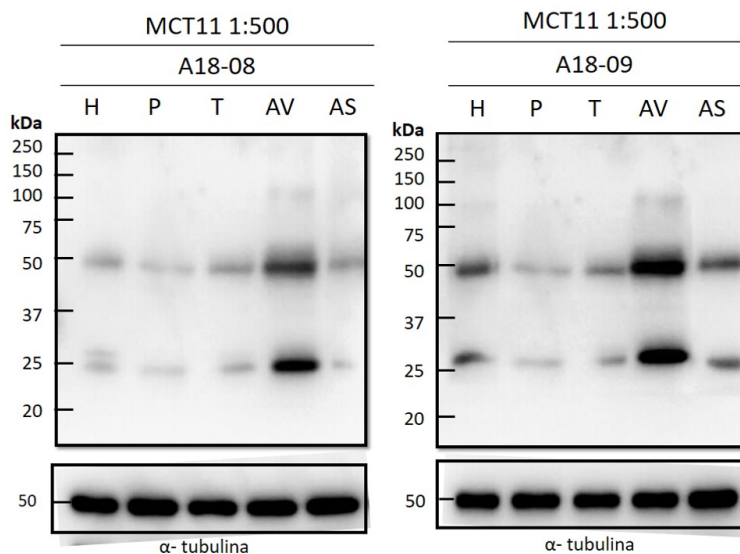


Figura 5.32: Identificación de la expresión de MCT11 en Hígado (H), Páncreas (P), Tiroides (T), Tejido Adiposo Visceral (AV) y Tejido Adiposo Subcutáneo (AS)

Evaluación de la expresión de MCT11 en tejidos humanos mediante réplicas tipo *Western blot*

Las muestras congeladas de los cinco órganos fueron procesadas para obtener extractos totales, de los cuales se realizó una réplica tipo *Western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal contra MCT11. La imagen se muestra en la figura 5.32, en la cual es posible observar que las dos bandas asociadas a MCT11 (25 kDa y 50 kDa) previamente descritas, están presentes en todos los tejidos.

A pesar de que la banda de 50 kDa estuvo presente en todos los tejidos, es posible apreciar a simple vista que en tejido adiposo visceral (AV) la banda es más intensa. Por lo que realizamos cuantificaciones de los niveles basales de MCT11 utilizando los niveles de la β -actina como control. La gráfica que se muestra en la figura 5.33, muestra que la cantidad de MCT11 fue más alta en tejido adiposo visceral (AV), seguida de tejido adiposo subcutáneo (AS), tiroides (T) hígado (H) y páncreas (P). Estos dos últimos presentaron un nivel de MCT11 muy similar.

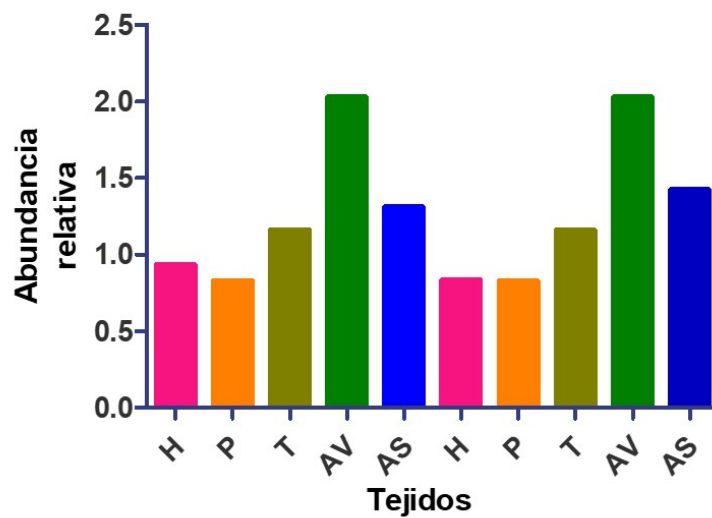


Figura 5.33: Cuantificación relativa de MCT11 en hígado (H), páncreas (P), tiroides (T), tejido adiposo visceral (AV) y tejido adiposo subcutáneo (AS)

El alto nivel de MCT11 en tejido adiposo visceral es muy relevante, ya que podría aclarar la relación entre el transportador con el metabolismo de lípidos.

Colocalización de MCT11 con distintos organelos celulares en tejidos humanos utilizando Inmunohistoquímica

Con el objetivo de evaluar la expresión de MCT11 y simultáneamente analizar su colocalización con núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisoma, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) con los anticuerpos monoclonales contra proteínas marcadoras de cada organelo utilizados en la sección de aislamiento de mitocondrias.

Los resultados se muestran en la figura 5.34, donde la expresión de MCT11 se marcó con color café, la expresión de las proteínas marcadoras con magenta y las colocalizaciones con rojizo además se resaltan con flechas. En las imágenes correspondientes al hígado, MCT11 se localiza en el retículo endoplásmico, mitocondria, núcleo y ligeramente con peroxisoma. Para la tiroides se aprecia que

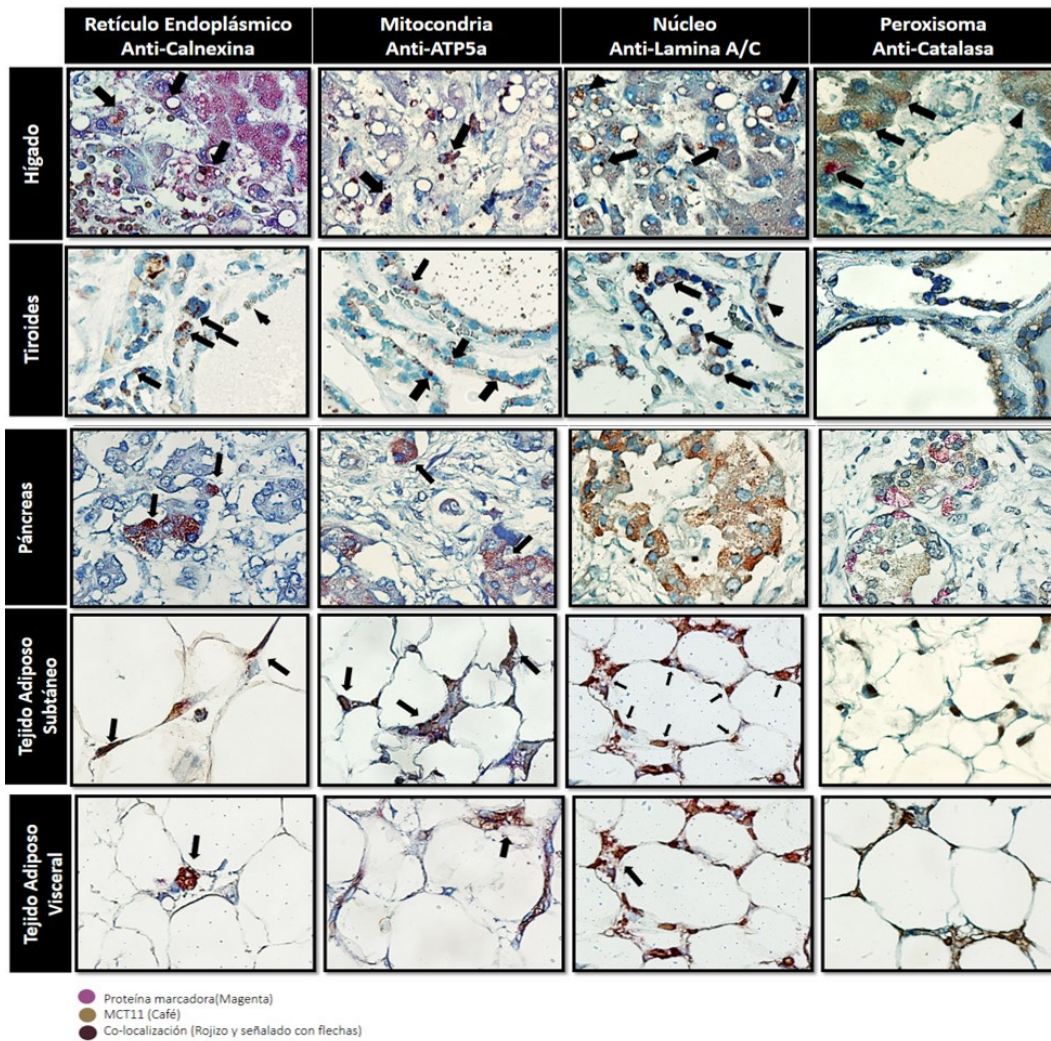


Figura 5.34: Localización intracelular de MCT11 en distintos tejidos humanos. La identificación de MCT11 se muestra en color café, la expresión de los marcadores para cada uno de los organelos celulares indicados en color magenta y la colocalización de ambas proteínas en color rojizo

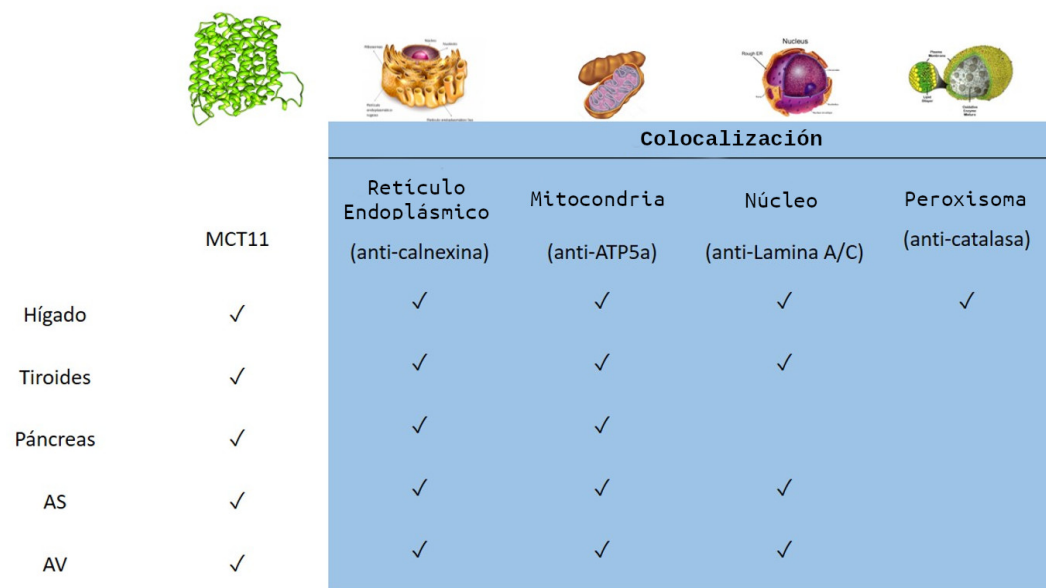


Figura 5.35: Localización de MCT11 en distintos compartimentos celulares a través de su colocalización con marcadores correspondientes a cada organelo en distintos tejidos humanos.

la localización de MCT11 se observa en el retículo endoplásmico, mitocondria y núcleo. En páncreas MCT11 se observa con el retículo endoplásmico y mitocondria. Los tejidos adiposos subcutáneo y visceral mostraron un patrón muy similar, donde MCT11 se localiza en el retículo endoplásmico, mitocondria y núcleo. Estos datos se resumen en la tabla de la figura 5.35.

Al revisar los trabajos publicados acerca de la localización de los transportadores MCTs en varios tejidos humanos [39, 41, 83], se encontró que los MCTs tipo I (MCT1, MCT2, MCT3 Y MCT4) muestran un patrón de expresión muy particular en páncreas, ya que solo se expresan en las acinos pancreáticos (parte exocrina) y no se expresan en los islotes de Langerhans (parte endócrina). Tomando en cuenta que por IHQ se identificó la presencia de MCT11 en páncreas y los antecedentes anteriormente mencionados, se decidió analizar la presencia de MCT11 en células β y células α del islote pancreático mediante IHQ con las muestras humanas utilizadas anteriormente. Las imágenes se muestran en la figura 5.36, en la que es posible

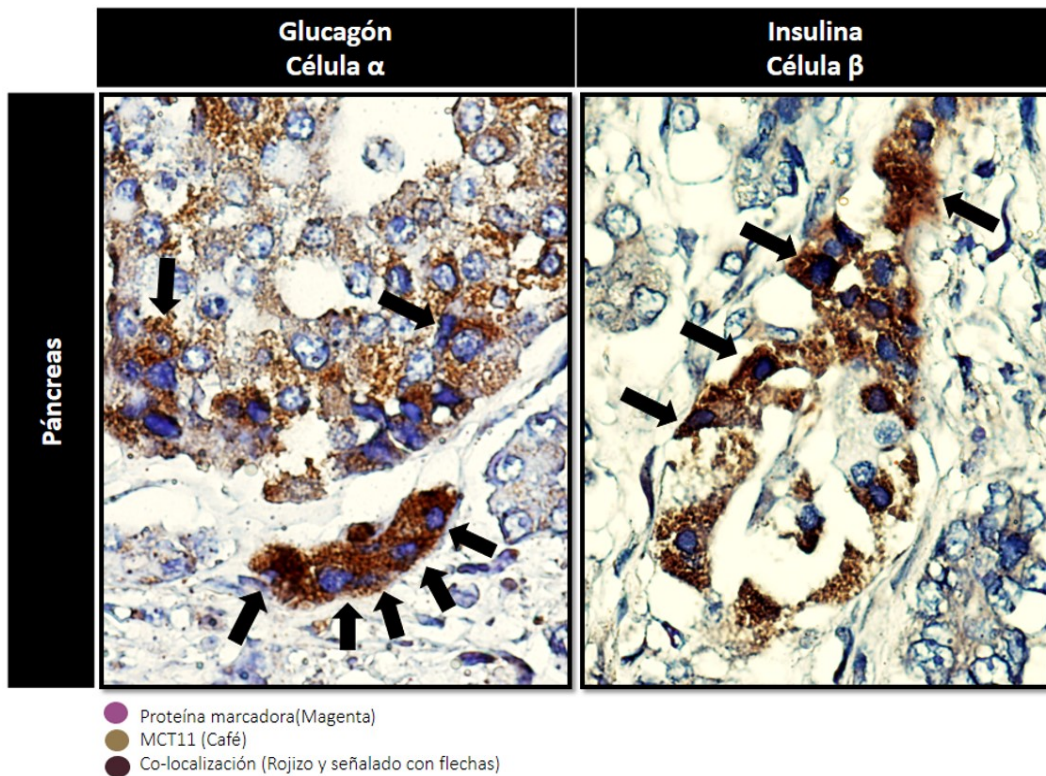


Figura 5.36: Inmunohistoquímica donde se analiza la expresión de MCT11 en células α y β de un islote pancreático

notar que MCT11 se localiza en el islote pancreático y además hay colocalización con glucagón con, un marcador de las células α , y colocalización con insulina, un marcador de las células β . Estos resultados muestran que MCT11 está expresado en islotes de Langerhans y sugieren que este transportador podría tener un rol fisiológico específico en estas células.

Discusión

A lo largo de este trabajo se recopiló evidencia acerca de la posible función y localización de MCT11. Primeramente, los resultados de nuestros análisis bioinformáticos sugieren que MCT11 podría tener más características en común con los miembros de clase II de la familia MCT, que con los de clase I. Sin embargo, la evidencia experimental en trabajos previos ha mostrado que MCT11 es capaz de transportar piruvato, aunque las constantes cinéticas como la afinidad por este ligando y la velocidad de transporte no han sido reportadas. Esto hace que aún no sea posible realizar una buena comparación funcional de MCT11 con los miembros tipo I, lo cual tiene mucha relevancia ya que las mayores diferencias entre los MCT 1-4 están dadas por sus afinidades relativas por sus sustratos. De manera adicional se puede mencionar que tampoco se ha explorado una gama amplia de ligandos para MCT11, por lo que el sustrato o sustratos preferenciales que podría estar transportando esta proteína en condiciones fisiológicas aún se mantienen desconocidos, por lo que no se descarta la posibilidad de que MCT11 pudiera estar mediando el transporte de moléculas más grandes e hidrofóbicas tal como se señala en los análisis de acoplamiento molecular de este trabajo.

A través del modelo estructural construido en este proyecto, fue posible identificar que en MCT11 de humano el aminoácido que se encuentra en la posición correspondiente al filtro de selectividad en MCT1, es una alanina (A353) en lugar de

una fenilalanina. Se ha estudiado esta fenilalanina en MCT1 de rata (Phe360) y en el trabajo de García et al. [84] se mostró que la mutante F360C donde se reemplaza esta fenilalanina por una cisteína, esto ocasiona que MCT1 sea capaz de transportar mevalonato, una molécula de seis carbonos; es decir, más grande que el piruvato o el lactato (tres carbonos), y al mismo tiempo reduce su capacidad para transportar estas moléculas. Otro punto importante es que, como se ha mencionado en varias secciones de este trabajo, menos de la mitad de los miembros de la familia MCT ha sido estudiada, por lo que la posibilidad de la existencia de una tercera clase podría ser también considerada. Dicho lo anterior, es necesario recopilar más evidencia experimental para poder clasificar adecuadamente MCT11.

En segunda instancia, la evidencia experimental obtenida en este trabajo sugiere que la proteína MCT11 es procesada pos-traduccionalmente, ya que se identificaron dos bandas de diferentes pesos moleculares : 50 kDa y 25 kDa. Por lo tanto, es muy probable que la banda de 50 kDa corresponda al monómero de MCT11, ya que el peso estimado de la proteína (48 kDa) corresponde con esta banda y la señal correspondiente en el gel 2D SDS-PAGE fue muy específica y bien delimitada. Con respecto a la banda de 25 kDa las evidencias son más difusas, ya que no se encontró una marca específica en el gel 2D SDS-PAGE, sino más bien líneas barridas que abarcaban varios puntos isoeléctricos. Esta evidencia sugiere que la proteína podría estarse procesando de diferentes maneras o que el anticuerpo esté identificando varias proteínas. Otra evidencia de este proceso se observó al sobreexpresar MCT11 en HEK293T, donde también se observó un procesamiento *in vitro* en el que se detectó MCT11 recombinante en un peso menor al esperado, de aproximadamente 37 kDa. Cabe mencionar que este suceso no se ha observado de manera aislada solo en este trabajo, sino también en los tres trabajos previos publicados [3,44,45], en los que se identifica a la proteína MCT11 recombinante en un peso similar a 37 kDa, incluso utilizando diferentes anticuerpos.

Existen varios trabajos experimentales acerca de MCT1, el miembro tipo I mejor estudiado, en los que reportan que el asa que une las hélices transmembranales seis y siete puede ser proteolizada generando dos fragmentos de 21-25 kDa y 22-28 kDa en geles SDS-PAGE [43, 77], resultando en un patrón de bandeo similar al observado en MCT11; sin embargo, estos sucesos solo han sido evaluados de manera *in vitro* y no hay hasta el momento ningún reporte de este corte en condiciones fisiológicas. Sin embargo, cuando el MCT11 fue sobre-expresado en sistemas bacterianos, MCT11 recombinante se identificó de igual manera en un peso de 37 kDa. Esto resulta interesante, ya que en bacterias la variable del procesamiento post-traducciona no debería tener lugar, por lo que la hipótesis de la proteólisis mencionada unos párrafos antes podría tener mayor probabilidad, sin embargo es necesario hacer más experimentos al respecto para llegar a una conclusión más certera.

Una buena estrategia para analizar estas proteínas sería realizar una inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal contra MCT11 y analizar las proteínas precipitadas mediante espectrometría de masas. Sin embargo existen varios retos experimentales que habría que resolver, ya que las cadenas pesadas y las ligeras de las IgGs del anticuerpo coinciden en peso con las bandas a analizar y podrían interferir en el análisis.

También es necesario mencionar la posibilidad de que la sobreexpresión de MCT11 sea una proteína tóxica para los sistemas de expresión, ya que en el sistema bacteriano en el que se sobreexpresó MCT11 se detectó un crecimiento sumamente lento comparado con los controles, luego de transformar las células con el plásmido que codifica para la proteína. Otra evidencia de esta hipótesis proviene de la imposibilidad de sobreexpresar MCT11 en células HepG2 a pesar de los múltiples intentos que se realizaron, lo cual podría sugerir que la sobreexpresión del transportador MCT11 es poco favorable para los sistemas biológicos. Esta premisa coincide con el hecho de

que *SLC16A11* es un gen de muy baja expresión en células humanas.

Con respecto a su distribución subcelular, la proteína MCT11 fue localizada en retículo endoplásmico, mitocondria, núcleo, vacuolas lipídicas y membrana plasmática mediante dos diferentes técnicas. La ubicación de MCT11 en retículo endoplásmico podría estar relacionada con su propia síntesis en este organelo, ya que para MCT1 está reportado que la síntesis ocurre en el retículo endoplásmico y posteriormente es procesada en el aparato de Golgi previo a su translocación en membrana plasmática, sitio donde se localiza mayoritariamente [39, 73]. De manera adicional, también se mantiene la posibilidad de que MCT11 esté jugando algún papel específico en el metabolismo de lípidos como se ha sugerido en las publicaciones previas [3, 25, 44, 45], en la síntesis de TAGs y en la acumulación de ácidos grasos en el mismo organelo.

Con respecto a la localización de MCT11 en mitocondria, existen varios aspectos que tienen que ser evaluados con más detalle. Primero, solo se identificó la forma de MCT11 de 25 kDa en fracciones enriquecidas de mitocondrias por inmuno-réplicas tipo *Western blot*, por lo que hasta no poder discernir la naturaleza de esta banda no es posible asegurar la localización de MCT11 en este organelo, ni hacer hipótesis acerca de su funcionamiento en él. De manera similar, existen varios reportes en los que se encontró la presencia de MCT1 en mitocondrias de corazón, músculo esquelético y cerebro, en los que se sugería que este transportador podría proveer un mecanismo para oxidar lactato como combustible para la respiración celular, no obstante, esta hipótesis de la "lanzadera de lactato" tuvo varios argumentos teóricos muy fuertes en contra, ya que la oxidación de lactato en el interior de la matriz mitocondrial es energéticamente desfavorable y no concuerda con lo que se sabe acerca de la compartimentalización del NADH dentro de las células, además las mitocondrias expresan una familia de transportadores que son bastante diferentes a la

familia SLC16, y de los que se tiene evidencia que son los principales transportadores de piruvato al interior de la mitocondria, por lo que era poco clara la posible función de MCT1 en este organelo [39, 73]. Evidencia experimental posterior, mostró que al someter los extractos enriquecidos de mitocondrias a rondas de centrifugaciones con densidad de gradiente, MCT1 era removido de la fracción mitocondrial, por lo que la presencia de la proteína en MCT1 en extractos enriquecidos de mitocondrias estaba asociado a una ligera contaminación debido al método utilizado y no se trataba de algún fenómeno fisiológico [39, 73].

Dados los antecedentes mencionados, algo parecido podría estar sucediendo para MCT11 en los extractos enriquecidos de mitocondrias de rata, por lo que habría que someter los extractos enriquecidos con mitocondrias a ultracentrifugaciones y evaluar si MCT11 persiste en ellos.

Por otra parte, la localización de MCT11 en vacuolas lipídicas representa un hallazgo importante, ya que al desempeñar una función en estos organelos podría establecerse un vínculo mucho más directo entre la función de MCT11 y su rol en el metabolismo de lípidos. De manera similar, la presencia de MCT11 en núcleo abre una gran gama de posibilidades acerca del posible rol fisiológico que podría tener esta proteína en ese compartimento subcelular.

La evaluación de la expresión de MCT11 a nivel de proteína en diferentes tejidos humanos aporta mucha información relevante, ya que en este trabajo se identificó que el tejido adiposo visceral y el tejido adiposo subcutáneo fueron los dos tejidos en los que se identificó mayor expresión de MCT11 comparado con hígado, tiroides y páncreas. Estos resultados son diferentes a los publicados por el consorcio SIGMA [25], en los que la cuantificación de mRNA sugería que el hígado, la glándula salival y la tiroides eran los órganos con mayor expresión de MCT11, por lo que de nueva cuenta se confirma que la abundancia de mRNA no correlaciona directamente con la

cantidad de proteína expresada en un tejido.

Otro aspecto muy importante es la identificación de la expresión de MCT11 en los islotes pancreáticos, sitio donde se ha reportado que no hay expresión de ningún transportador de monocarboxilatos, por lo que es probable que MCT11 esté desempeñando un rol específico en células $\alpha\beta$. En particular, en lo referente a la regulación de la secreción de insulina y glucagon, por lo que el MCT11 podría tener una función específica en el metabolismo de la glucosa y una relación muy directa con la fisiopatología de la DT2.

A pesar de los múltiples esfuerzos simultáneos que se están haciendo para caracterizar MCT11, aún no ha sido posible responder a fondo preguntas fundamentales acerca de su funcionamiento, como ¿Dónde se encuentra? y ¿Qué transporta?. Esto nos deja con más preguntas que respuestas. Por ejemplo, si otros miembros de la familia MCT (MCT1, MCT2, MCT3 y MCT4) se expresan abundantemente en el hígado y otros tejidos, y además poseen una mayor afinidad por el piruvato y el lactato, ¿Por qué la función de MCT11 es distinta? ¿Tendrá MCT11 mayor afinidad por otros ligandos? ¿No hemos identificado su ligando fisiológico? ¿La función de cada MCT es dominante bajo diferentes condiciones?. Otro aspecto que aún no posee respuesta es la relación bioquímica que conecta la función de MCT11 con el metabolismo de lípidos así como tampoco una de las preguntas más importantes que motiva el estudio de esta proteína: ¿Cómo el haplotipo de riesgo aumenta el riesgo a DT2?.

Aunque aún estamos lejos de explicar a nivel molecular las disfunciones asociadas al riesgo a padecer la DT2, es posible que la información generada acerca de la proteína MCT11 pueda ser de utilidad para el diseño de fármacos que mitiguen el riesgo genético a la DT2 en nuestra población.

Conclusiones y Perspectivas

7.1. Conclusiones

- Los análisis bioinformáticos sugieren que MCT11 tiene una estructura conformada por 12 segmentos transmembranales con el N-terminal y el C-terminal intracelulares, y además guarda más similitudes con los miembros tipo II de la familia MCT.
- En hígado de humano y de rata se identificaron dos bandas correspondientes a MCT11, una de 50 kDa y otra de 25 kDa.
- En hígado humano, se identificó la expresión de MCT11 en membrana plasmática, retículo endoplásmico, mitocondria, núcleo, vacuolas lipídicas y peroxisomas.
- MCT11 se encuentra en hígado y páncreas, tiroides, tejido adiposo subcutáneo y tejido adiposo visceral en humanos, siendo este último el tejido que presentó un mayor nivel basal de MCT11.
- MCT11 está presente en células α y β pancreáticas.

7.2. Perspectivas

- Una de las mayores limitaciones de este estudio fue que las muestras humanas utilizadas son provenientes de autopsias, por lo que resultaría de gran utilidad tener acceso a tejido sano para poder hacer los análisis bioquímicos y subcelulares.
- Conocer con precisión la naturaleza de la banda en 25 kDa reconocida por el anticuerpo anti-MCT11 mediante espectrometría de masas para poder dilucidar si la marca corresponde a algún procesamiento post-traducciona l de MCT11 o se trata de alguna interacción no específica del anticuerpo con alguna otra proteína.
- Aislar los organelos subcelulares en los que se identificó MCT11 (retículo endoplásmico, peroxisomas, vacuolas lipídicas, núcleo y membrana plasmática), con el objetivo de verificar la localización de MCT11 en ellos.
- Caracterizar la función de MCT11, para discernir cuál es su ligando preferencial en membranas internas redirigiendo la proteína a membrana plasmática o utilizando electrofisiología basada en membranas sólidas (*SSM-based electrophysiology*)
- Analizar de manera más detallada la expresión de MCT11 en células β pancreáticas para evaluar si el transportador está desempeñando un rol específico en ellas.

Bibliografía

- [1] V. T. Samuel and G. I. Shulman, “Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links,” *Cell*, vol. 148, no. 5, pp. 852–871, 2012.
- [2] M. Hernández-Ávila, J. P. Gutiérrez, and N. Reynoso-Noverón, “Diabetes mellitus in mexico: Status of the epidemic,” *salud pública de méxico*, vol. 55, pp. s129–s136, 2013.
- [3] V. Rusu, E. Hoch, J. M. Mercader, D. E. Tenen, M. Gymrek, C. R. Hartigan, M. DeRan, M. von Grotthuss, P. Fontanillas, A. Spooner, *et al.*, “Type 2 diabetes variants disrupt function of *slc16a11* through two distinct mechanisms,” *Cell*, vol. 170, no. 1, pp. 199–212, 2017.
- [4] J. Diamond, “The double puzzle of diabetes,” *Nature*, vol. 423, no. 6940, pp. 599–602, 2003.
- [5] A. D. Association *et al.*, “Diagnosis and classification of diabetes mellitus,” *Diabetes care*, vol. 37, no. Supplement 1, pp. S81–S90, 2014.
- [6] K. Cusi, “The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes,” *Current diabetes reports*, vol. 10, no. 4, pp. 306–315, 2010.
- [7] A. D. Mooradian, “Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus,” *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 5, no. 3, pp. 150–159, 2009.

- [8] M. Krssak, K. F. Petersen, A. Dresner, L. DiPietro, S. Vogel, D. Rothman, G. Shulman, and M. Roden, “Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1h nmr spectroscopy study,” *Diabetologia*, vol. 42, no. 1, pp. 113–116, 1999.
- [9] S. I. Itani, N. B. Ruderman, F. Schmieder, and G. Boden, “Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase c, and $\text{ikb-}\alpha$,” *Diabetes*, vol. 51, no. 7, pp. 2005–2011, 2002.
- [10] J. Müller, *The role of diacylglycerol concentrations in the development of lipid-mediated insulin resistance in human skeletal muscle*. PhD thesis, Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2014.
- [11] S. M. Rappaport, “Genetic factors are not the major causes of chronic diseases,” *PLoS one*, vol. 11, no. 4, p. e0154387, 2016.
- [12] K. F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, M. Lehrke, R. E. Hendler, and G. I. Shulman, “Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes,” *Diabetes*, vol. 54, no. 3, pp. 603–608, 2005.
- [13] E. Fabbrini, R. A. Tamboli, F. Magkos, P. A. Marks-Shulman, A. W. Eckhauser, W. O. Richards, S. Klein, and N. N. Abumrad, “Surgical removal of omental fat does not improve insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in obese adults,” *Gastroenterology*, vol. 139, no. 2, pp. 448–455, 2010.
- [14] H.-Y. Lee, A. L. Birkenfeld, F. R. Jornayvaz, M. J. Jurczak, S. Kanda, V. Popov, D. W. Frederick, D. Zhang, B. Guigni, K. G. Bharadwaj, *et al.*, “Apolipoprotein ciii overexpressing mice are predisposed to diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance,” *Hepatology*, vol. 54, no. 5, pp. 1650–1660, 2011.

- [15] D. Zhang, Z.-X. Liu, C. S. Choi, L. Tian, R. Kibbey, J. Dong, G. W. Cline, P. A. Wood, and G. I. Shulman, “Mitochondrial dysfunction due to long-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 43, pp. 17075–17080, 2007.
- [16] H. Cortez-Pinto, J. Chatham, V. Chacko, C. Arnold, A. Rashid, and A. M. Diehl, “Alterations in liver atp homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study,” *Jama*, vol. 282, no. 17, pp. 1659–1664, 1999.
- [17] A. I. Schmid, J. Szendroedi, M. Chmelik, M. Krššák, E. Moser, and M. Roden, “Liver atp synthesis is lower and relates to insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes,” *Diabetes care*, vol. 34, no. 2, pp. 448–453, 2011.
- [18] N. E. Sunny, E. J. Parks, J. D. Browning, and S. C. Burgess, “Excessive hepatic mitochondrial tca cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease,” *Cell metabolism*, vol. 14, no. 6, pp. 804–810, 2011.
- [19] Y. L. F. E. M. B. S. E. J. C. H. G. S. . K. S. Gregor, M. F., “Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss,” *Diabetes*, vol. 58, no. 3, pp. 693–700, 2009.
- [20] A.-H. Lee, K. Heidtman, G. S. Hotamisligil, and L. H. Glimcher, “Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by ire1 α and xbp1 in proinsulin processing and insulin secretion,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 21, pp. 8885–8890, 2011.
- [21] C. Q. Y. E. L. A. H. I. N. N. O. E. . . H. G. S. Ozcan, U., “Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes,” *Science*, vol. 306, no. 5695, pp. 457–461, 2004.

- [22] H. J. S. G. C. L. K. M. . H. G. S. Tuncman, G., “Functional in vivo interactions between jnk1 and jnk2 isoforms in obesity and insulin resistance,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 28, pp. 10741–10746, 2006.
- [23] R. B. Prasad and L. Groop, “Genetics of type 2 diabetes—pitfalls and possibilities,” *Genes*, vol. 6, no. 1, pp. 87–123, 2015.
- [24] M. Traurig, R. L. Hanson, A. Marinelarena, S. Kobes, P. Piaggi, S. Cole, J. E. Curran, J. Blangero, H. Göring, S. Kumar, *et al.*, “Analysis of slc16a11 variants in 12,811 american indians: genotype-obesity interaction for type 2 diabetes and an association with rnasek expression,” *Diabetes*, vol. 65, no. 2, pp. 510–519, 2016.
- [25] S. T. . D. Consortium *et al.*, “Sequence variants in slc16a11 are a common risk factor for type 2 diabetes in mexico,” *Nature*, vol. 506, no. 7486, pp. 97–101, 2014.
- [26] T. M. Frayling, “Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 8, no. 9, p. 657, 2007.
- [27] A. L. Gloyn, M. N. Weedon, K. R. Owen, M. J. Turner, B. A. Knight, G. Hitman, M. Walker, J. C. Levy, M. Sampson, S. Halford, *et al.*, “Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic β -cell katp channel subunits kir6. 2 (kcnj11) and sur1 (abcc8) confirm that the kcnj11 e23k variant is associated with type 2 diabetes,” *Diabetes*, vol. 52, no. 2, pp. 568–572, 2003.
- [28] E.-M. D. Nielsen, L. Hansen, B. Carstensen, S. M. Echwald, T. Drivsholm, C. Glümer, B. Thorsteinsson, K. Borch-Johnsen, T. Hansen, and O. Pedersen, “The e23k variant of kir6. 2 associates with impaired post-ogtt serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes,” *Diabetes*, vol. 52, no. 2, pp. 573–577, 2003.

- [29] D. Altshuler, J. N. Hirschhorn, M. Klannemark, C. M. Lindgren, M.-C. Vohl, J. Nemes, C. R. Lane, S. F. Schaffner, S. Bolk, C. Brewer, *et al.*, “The common ppar γ pro12ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes,” *Nature genetics*, vol. 26, no. 1, p. 76, 2000.
- [30] I. Barroso, M. Gurnell, V. Crowley, M. Agostini, J. Schwabe, M. Soos, G. L. Maslen, T. Williams, H. Lewis, A. Schafer, *et al.*, “Dominant negative mutations in human ppar γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension,” *Nature*, vol. 402, no. 6764, p. 880, 1999.
- [31] J. Gudmundsson, P. Sulem, V. Steinthorsdottir, J. T. Bergthorsson, G. Thorleifsson, A. Manolescu, T. Rafnar, D. Gudbjartsson, B. A. Agnarsson, A. Baker, *et al.*, “Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in tcf2 protects against type 2 diabetes,” *Nature genetics*, vol. 39, no. 8, p. 977, 2007.
- [32] W. Winckler, M. N. Weedon, R. R. Graham, S. A. McCarroll, S. Purcell, P. Almgren, T. Tuomi, D. Gaudet, K. B. Boström, M. Walker, *et al.*, “Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (mody) genes for association with type 2 diabetes,” *Diabetes*, vol. 56, no. 3, pp. 685–693, 2007.
- [33] M. S. Sandhu, M. N. Weedon, K. A. Fawcett, J. Wasson, S. L. Debenham, A. Daly, H. Lango, T. M. Frayling, R. J. Neumann, R. Sherva, *et al.*, “Common variants in wfs1 confer risk of type 2 diabetes,” *Nature genetics*, vol. 39, no. 8, p. 951, 2007.
- [34] A. Moreno-Estrada, C. R. Gignoux, J. C. Fernández-López, F. Zakharia, M. Sikora, A. V. Contreras, V. Acuña-Alonzo, K. Sandoval, C. Eng, S. Romero-Hidalgo, *et al.*, “The genetics of Mexico recapitulates native

- american substructure and affects biomedical traits,” *Science*, vol. 344, no. 6189, pp. 1280–1285, 2014.
- [35] M. Rebsamen, L. Pochini, T. Stasyk, M. E. de Araújo, M. Galluccio, R. K. Kandasamy, B. Snijder, A. Fauster, E. L. Rudashevskaya, M. Bruckner, *et al.*, “Slc38a9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mtorc1,” *Nature*, vol. 519, no. 7544, p. 477, 2015.
- [36] A. S. Terker, C. Zhang, J. A. McCormick, R. A. Lazelle, C. Zhang, N. P. Meermeier, D. A. Siler, H. J. Park, Y. Fu, D. M. Cohen, *et al.*, “Potassium modulates electrolyte balance and blood pressure through effects on distal cell voltage and chloride,” *Cell metabolism*, vol. 21, no. 1, pp. 39–50, 2015.
- [37] N. E. Hoffman, H. C. Chandramoorthy, S. Shanmughapriya, X. Q. Zhang, S. Vallem, P. J. Doonan, K. Malliankaraman, S. Guo, S. Rajan, J. W. Elrod, *et al.*, “Slc25a23 augments mitochondrial ca²⁺ uptake, interacts with mcu, and induces oxidative stress–mediated cell death,” *Molecular biology of the cell*, vol. 25, no. 6, pp. 936–947, 2014.
- [38] P. D. Velentzas, L. Zhang, G. Das, T.-K. Chang, C. Nelson, W. R. Kobertz, and E. H. Baehrecke, “The proton-coupled monocarboxylate transporter hermes is necessary for autophagy during cell death,” *Developmental cell*, vol. 47, no. 3, pp. 281–293, 2018.
- [39] A. P. Halestrap and M. C. Wilson, “The monocarboxylate transporter family—role and regulation,” *IUBMB life*, vol. 64, no. 2, pp. 109–119, 2012.
- [40] A. P. Halestrap, “The monocarboxylate transporter family—structure and functional characterization,” *IUBMB life*, vol. 64, no. 1, pp. 1–9, 2012.
- [41] A. P. Halestrap, “The slc16 gene family—structure, role and regulation in health and disease,” *Molecular aspects of medicine*, vol. 34, no. 2, pp. 337–349, 2013.

- [42] C. Manoharan, C. Manoharan, M. C. Wilson, C. Manoharan, M. C. Wilson, R. B. Sessions, and A. P. Halestrap, “The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity,” *Molecular membrane biology*, vol. 23, no. 6, pp. 486–498, 2006.
- [43] M. C. Wilson, D. Meredith, C. Bunnun, R. B. Sessions, and A. P. Halestrap, “Studies on the dids binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle,” *Journal of Biological Chemistry*, pp. jbc–M109, 2009.
- [44] W. Kim, A. Deik, C. Gonzalez, M. E. Gonzalez, F. Fu, M. Ferrari, C. L. Churchhouse, J. C. Florez, S. B. Jacobs, C. B. Clish, *et al.*, “Polyunsaturated fatty acid desaturation is a mechanism for glycolytic nad⁺ recycling,” *Cell metabolism*, 2019.
- [45] Y. Zhao, Z. Feng, Y. Zhang, Y. Sun, Y. Chen, X. Liu, S. Li, T. Zhou, L. Chen, Y. Wei, *et al.*, “Gain-of-function mutations of slc16a11 contribute to the pathogenesis of type 2 diabetes,” *Cell reports*, vol. 26, no. 4, pp. 884–892, 2019.
- [46] Y. Zhang, “I-tasser server for protein 3d structure prediction,” *BMC bioinformatics*, vol. 9, no. 1, p. 40, 2008.
- [47] Y. Zhang, “I-tasser: Fully automated protein structure prediction in casp8,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 77, no. S9, pp. 100–113, 2009.
- [48] A. Roy, A. Kucukural, and Y. Zhang, “I-tasser: a unified platform for automated protein structure and function prediction,” *Nature protocols*, vol. 5, no. 4, pp. 725–738, 2010.

- [49] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, and Y. Zhang, “The i-tasser suite: protein structure and function prediction,” *Nature methods*, vol. 12, no. 1, pp. 7–8, 2015.
- [50] P. Bradley, D. Chivian, J. Meiler, K. M. Misura, C. A. Rohl, W. R. Schief, W. J. Wedemeyer, O. Schueler-Furman, P. Murphy, J. Schonbrun, *et al.*, “Rosetta predictions in casp5: successes, failures, and prospects for complete automation,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 53, no. S6, pp. 457–468, 2003.
- [51] K. T. Simons, I. Ruczinski, C. Kooperberg, B. A. Fox, C. Bystroff, and D. Baker, “Improved recognition of native-like protein structures using a combination of sequence-dependent and sequence-independent features of proteins,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 34, no. 1, pp. 82–95, 1999.
- [52] K. T. Simons, C. Kooperberg, E. Huang, and D. Baker, “Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and bayesian scoring functions,” *Journal of molecular biology*, vol. 268, no. 1, pp. 209–225, 1997.
- [53] N. Guex, M. C. Peitsch, and T. Schwede, “Automated comparative protein structure modeling with swiss-model and swiss-pdbviewer: A historical perspective,” *Electrophoresis*, vol. 30, no. S1, pp. S162–S173, 2009.
- [54] S. Bienert, A. Waterhouse, T. A. de Beer, G. Tauriello, G. Studer, L. Bordoli, and T. Schwede, “The swiss-model repository—new features and functionality,” *Nucleic acids research*, vol. 45, no. D1, pp. D313–D319, 2016.
- [55] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, *et al.*, “Swiss-model:

- homology modelling of protein structures and complexes,” *Nucleic acids research*, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303, 2018.
- [56] O. Trott and A. J. Olson, “Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,” *Journal of computational chemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, 2010.
- [57] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, “Ucsf chimera—a visualization system for exploratory research and analysis,” *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [58] G. M. Boratyn, A. A. Schäffer, R. Agarwala, S. F. Altschul, D. J. Lipman, and T. L. Madden, “Domain enhanced lookup time accelerated blast,” *Biology direct*, vol. 7, no. 1, p. 12, 2012.
- [59] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool,” *Journal of molecular biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, 1990.
- [60] K. Katoh, K. Misawa, K.-i. Kuma, and T. Miyata, “Mafft: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform,” *Nucleic acids research*, vol. 30, no. 14, pp. 3059–3066, 2002.
- [61] K. Katoh and D. M. Standley, “Mafft multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability,” *Molecular biology and evolution*, vol. 30, no. 4, pp. 772–780, 2013.
- [62] R. Lanfear, P. B. Frandsen, A. M. Wright, T. Senfeld, and B. Calcott, “Partitionfinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses,” *Molecular biology and evolution*, vol. 34, no. 3, pp. 772–773, 2017.

- [63] A. Stamatakis, “Raxml version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 9, pp. 1312–1313, 2014.
- [64] X. Yang, J. S. Boehm, X. Yang, K. Salehi-Ashtiani, T. Hao, Y. Shen, R. Lubonja, S. R. Thomas, O. Alkan, T. Bhimdi, *et al.*, “A public genome-scale lentiviral expression library of human orfs,” *Nature methods*, vol. 8, no. 8, p. 659, 2011.
- [65] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4,” *nature*, vol. 227, no. 5259, p. 680, 1970.
- [66] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979.
- [67] B. Bjellqvist, K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier, and W. Postel, “Isoelectric focusing in immobilized ph gradients: principle, methodology and some applications,” *Journal of biochemical and biophysical methods*, vol. 6, no. 4, pp. 317–339, 1982.
- [68] R. Moreno-Sanchez, “Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the atp synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria.” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, no. 23, pp. 12554–12560, 1985.
- [69] D. Chivian, D. E. Kim, L. Malmström, P. Bradley, T. Robertson, P. Murphy, C. E. Strauss, R. Bonneau, C. A. Rohl, and D. Baker, “Automated prediction of casp-5 structures using the robetta server,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 53, no. S6, pp. 524–533, 2003.

- [70] Y. Song, F. DiMaio, R. Y.-R. Wang, D. Kim, C. Miles, T. Brunette, J. Thompson, and D. Baker, “High-resolution comparative modeling with rosetta,” *Structure*, vol. 21, no. 10, pp. 1735–1742, 2013.
- [71] S. Raman, R. Vernon, J. Thompson, M. Tyka, R. Sadreyev, J. Pei, D. Kim, E. Kellogg, F. DiMaio, O. Lange, *et al.*, “Structure prediction for casp8 with all-atom refinement using rosetta,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 77, no. S9, pp. 89–99, 2009.
- [72] R. T. Kroemer, “Structure-based drug design: docking and scoring,” *Current protein and peptide science*, vol. 8, no. 4, pp. 312–328, 2007.
- [73] J. Adijanto and N. J. Philp, “The slc16a family of monocarboxylate transporters (mcts)—physiology and function in cellular metabolism, ph homeostasis, and fluid transport,” in *Current topics in membranes*, vol. 70, pp. 275–312, Elsevier, 2012.
- [74] C. K. Garcia, M. S. Brown, R. K. Pathak, and J. L. Goldstein, “cdna cloning of mct2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than mct1,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 4, pp. 1843–1849, 1995.
- [75] T. Gabaldón, “Evolution of proteins and proteomes: a phylogenetics approach,” *Evolutionary Bioinformatics*, vol. 1, p. 117693430500100004, 2005.
- [76] K. Suhre, S.-Y. Shin, A.-K. Petersen, R. P. Mohny, D. Meredith, B. Wägele, E. Altmaier, P. Deloukas, J. Erdmann, E. Grundberg, *et al.*, “Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research,” *Nature*, vol. 477, no. 7362, pp. 54–60, 2011.
- [77] R. C. Poole and A. P. Halestrap, “Interaction of the erythrocyte lactate transporter (monocarboxylate transporter 1) with an integral 70-kda membrane

glycoprotein of the immunoglobulin superfamily,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 23, pp. 14624–14628, 1997.

- [78] B. H. Jhun, C. J. Berenski, J. D. Craik, A. R. Paterson, C. E. Cass, and C. Y. Jung, “Glucose and nucleoside transporters of human erythrocytes: effects of detergents on immunoadsorption of a membrane protein to its monoclonal antibody,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1061, no. 2, pp. 149–155, 1991.
- [79] H. Furthmayr and V. Marchesi, “Subunit structure of human erythrocyte glycophorin a,” *Biochemistry*, vol. 15, no. 5, pp. 1137–1144, 1976.
- [80] N. B. Javitt, “Hepg2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids.,” *The FASEB Journal*, vol. 4, no. 2, pp. 161–168, 1990.
- [81] P. A. Watkins, E. V. Ferrell, J. I. Pedersen, and G. Hoefler, “Peroxisomal fatty acid β -oxidation in hepg2 cells,” *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 289, no. 2, pp. 329–336, 1991.
- [82] M. J. Schönenberger and W. J. Kovacs, “Isolation of peroxisomes from mouse brain using a continuous nycodenz gradient: a comparison to the isolation of liver and kidney peroxisomes,” in *Peroxisomes*, pp. 13–26, Springer, 2017.
- [83] A. P. Halestrap and D. Meredith, “The slc16 gene family—from monocarboxylate transporters (mcts) to aromatic amino acid transporters and beyond,” *Pflügers Archiv*, vol. 447, no. 5, pp. 619–628, 2004.
- [84] C. K. Garcia, J. L. Goldstein, R. K. Pathak, R. G. Anderson, and M. S. Brown, “Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the cori cycle,” *Cell*, vol. 76, no. 5, pp. 865–873, 1994.