



UNIVERSIDAD DE TALCA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL EN BIOINFOMÁTICA

Transporte de nicotinato y compuestos relacionados mediado por el transportador de monocarboxilatos acoplado a sodio (SMCT1).

JULIO IGNACIO SALGADO IBARRA

Profesor Tutor: DRA. ARIELA VERGARA JAQUE

Cotutor: ROBERTO ROSALES ROJAS

Profesor Infórmate: DR. JULIO CABALLERO RUIZ

Memoria para optar al título de Ingeniero civil en bioinformática

Diciembre, 2021

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	8
1.1	Proteínas cotransportadoras y su importancia: Familia SLC5.....	8
1.2	Transportador SMCT1: Estructura y Función.....	11
1.3	Unión de monocarboxilatos: Nicotinato y compuestos relacionados.....	13
1.4	Mutaciones que afectan la unión a sustratos en SMCT1.....	15
1.5	Planteamiento de investigación.....	17
2.	HIPÓTESIS.....	18
3.	OBJETIVOS.....	18
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
	4.1. Modelado de la proteína SMCT1 sobre la base de una estructura templado actualizada. Relativo al objetivo específico 1.	19
4.1.1.	Modelado por homología de SMCT1	20
4.1.2	Evaluación de la calidad del Modelo de SMCT1.	22
4.1.3	Comparación entre el modelo de SMCT1/MODELLER y SMCT1/ALPHAFOLD... ¡Error! Marcador no definido.	
	4.2. Estudios de acoplamiento molecular para SMCT1 interactuando con nicotinato y compuestos relacionados. Relativo al objetivo específico 2.	22
4.2.1.	Obtención de la estructura de nicotinato y compuestos relacionados.....	23
4.2.2.	Caracterización fisicoquímica de los compuestos.	24
4.2.3	Acoplamiento molecular de los compuestos (<i>Docking</i>).	24
4.2.4	Selección de compuestos para la caracterización de los sistemas proteína:ligando.	25
	4.3 Identificación de residuos claves en la interacción de SMCT1 con nicotinato y compuestos relacionados. Relativo al objetivo específico 3.	26
	4.4. Estudios de simulación molecular de la asociación de compuestos de diversa afinidad con SMCT1. Relativo al objetivo específico 4.	26
4.4.1	Simulación de dinámica molecular.	27
4.4.2	Construcción de los sistemas para simulaciones de dinámica molecular.	28
4.4.3	Construcción de la mutante T91G.	28
4.4.4	Implementación para simulaciones de dinámica molecular.	29
	4.5. Evaluación de la unión de nicotinato con SMCT1 wildtype y bajo la mutación T91G. Relativo al objetivo específico 5.	30

4.5.1 Análisis de RMSD.....	30
4.5.2 Alineamientos estructurales de los sitios de unión a ligando.....	31
4.5.3 Análisis de distancias entre el ligando, residuos putativos y átomos específicos.	31
5.1 Modelado de la proteína SMCT1 sobre la base de una estructura templado actualizada.....	32
5.1.1 Modelado por homología de SMCT1	32
4.1.2 Evaluación de la calidad del Modelo de SMCT1.	33
5.2 Estudios de acoplamiento molecular para SMCT1 interactuando con nicotinato y compuestos relacionados.	36
5.2.1 Verificación de estructuras para ligandos.....	36
5.2.2 Estudios de acoplamiento molecular.....	37
5.3 Identificación de residuos clave en la interacción de SMCT1 con nicotinato y compuestos relacionados.	41
5.4 Estudios de simulación molecular de la asociación de compuestos de diversa afinidad con SMCT1.....	42
5.4.1 Comparación entre sistemas SMT1:Nicotinato / SMTC1:Metilnicotinato.	42
5.4.2 Comparación entre sistemas SMT1_WT:Nicotinato / SMTC1_T91G:Nicotinato.....	48
5.5 Evaluación de la unión de nicotinato con SMCT1 wild type y bajo la mutación T91G.	50
6. CONCLUSIONES.....	52
7. REFERENCIAS.....	54
8. ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de la familia de transportadores dependientes de sodio SLC5.	10
Figura 2. Modelo tridimensional por homología del transportador SMCT1.	12
Figura 3. Estructura de nicotinato y compuestos relacionados.	14
Figura 4. Transporte de nicotinato y compuestos estructuralmente relacionados mediado por SMCT1 humano.....	15
Figura 5. Transporte de nicotinato mediado por SMCT1 WT y mutado.	16
Figura 6. Análisis de predicción de estructura secundaria (PSIPRED) y segmentos transmembranales (TOPCONS) para SMCT1.....	21
Figura 7. Recaptación de nicotinato con radio marcaje de carbono 14 en presencia de nicotinato sin radio marcaje, análogos estructurales de nicotinato y monocarboxilatos.....	23
Figura 8. Ecuación de la función de energía potencial utilizada para aproximar fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular.....	28
Figura 9. Modelo molecular de la estructura del transportador SMCT1.....	34
Figura 10. La predicción muestra que los residuos que componen el sitio putativo de unión a ligando poseen puntajes por sobre los 0.7 de <i>score</i> ProQM.....	35
Figura 11. Gráfico de Ramachandran.....	36
Figura 12: Alineamiento estructural generado a partir del servidor TM-Align.....	37
Figura 13.(A) Población de los estados de protonación para cada compuesto estudiado.....	38
Figura 13.(B) Gráfico de las curvas del coeficiente de distribución en el rango de pH 1 a 8.....	39
Figura 14. Confórmeros de menor energía generados para nicotinato y metilnicotinato.....	42
Figura 15. Resumen de la búsqueda de residuos consenso entre los 15 compuestos.....	43
Figura 16. Simulación de dinámica molecular para nicotinato en sistema wild type.....	44
Figura 17. Simulación de dinámica molecular para metilnicotinato en el sistema SMCT1 wild type.....	46
Figura 18. Gráfico de frecuencia en los 45 ns finales de simulación de dinámica molecular para nicotinato y metilnicotinato interactuando con el sistema SMCT1 wild type.....	45
Figura 19. Simulación de dinámica molecular nicotinato en el sistema SMCT1 wild type.....	48
Figura 20. Simulación de dinámica molecular metilnicotinato en el sistema SMCT1 wild type.....	49
Figura 21. Simulación de dinámica molecular nicotinato en el sistema SMCT1 mutación T91G.....	51
Figura 22. Comparación de distancias, RMSD en sistemas SMCT1 wild type y con la mutación T91G.....	52
Figura 23. Comparación estructural sistemas SMCT1 wild type y con la mutación T91G.....	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Ranking de los 15 compuestos estudiados empleando el método de puntuación Glide XP.	39
--	-----------

RESUMEN

Las proteínas de membrana tienen una gran importancia biológica, debido a que juegan un papel fundamental en distintos procesos que regulan una larga lista de enfermedades. Estas proteínas son cruciales para el transporte de sustratos en la célula, por lo que pueden actuar fácilmente como dianas biológicas, logrando desencadenar alguna respuesta farmacológica deseada. La familia SCL5, es una familia de cotransportadores de monocarboxilatos acoplado a sodio, que contempla 12 proteínas en el genoma humano. Existen varios estudios que reportan la importancia de esta familia en procesos de captación de azúcares, vitaminas y aminoácidos, sin embargo, los mecanismos estructurales asociados al transporte de solutos aún no son del todo caracterizados. Principalmente el gen SLC5A8, el cual codifica el transportador 1 de monocarboxilatos y cadenas cortas de ácidos grasos acoplado a sodio (SMCT1, del inglés *Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*), ha sido asociado a la recaptación de monocarboxilatos en distintos órganos humanos. En este ámbito, investigaciones recientes a cerca del transporte de nicotinato, una vitamina del complejo B tipo monocarboxilato, han demostrado una reducción en el transporte de esta molécula debido a una mutación puntual en el residuo treonina 91 de SMCT1. En la presente investigación se utilizó una estrategia de modelado por homología de proteínas para generar un modelo del transportador SMCT1 en una conformación orientada hacia el medio externo. Acoplamiento molecular para la búsqueda de confórmeros que representaran el modo de unión de nicotinato y compuestos relacionados de variada afinidad para SMCT1, para finalmente aplicar metodologías de simulación molecular caracterizando estructuralmente los elementos claves que regulan la captación de estos compuestos, además de estudiar el efecto la mutación treonina 91 por glicina (T91G) y como esto incide en el transporte de sustratos. Los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación sugieren que los residuos F65, F85, F88, Y92 y W253 son residuos importantes en la captación de compuestos, por otro lado, el residuo treonina 91 presenta un rol estructural en donde su mutación por glicina, que termina provocando la distorsión en las cadenas laterales de Y92 y W253 produce la inestabilidad de estos complejos.

ABSTRACT

Membrane proteins are of great biological importance, since they play a fundamental role in different processes that regulate a long list of diseases. These proteins are crucial for the transport of substrates in the cell, so they can easily act as biological targets, triggering a desired pharmacological response. The SCL5 family is a family of sodium-coupled monocarboxylate cotransporters, which includes 12 proteins in the human genome. There are several studies that report the importance of this family in the uptake of sugars, vitamins and amino acids; however, the structural mechanisms associated with solute transport have not yet been fully characterized. Mainly the SLC5A8 gene, which encodes the sodium-coupled monocarboxylate and short-chain fatty acid transporter 1 (SMCT1), has been associated with the reuptake of monocarboxylates in different human organs. In this field, recent research on the transport of nicotinate, a monocarboxylate-type B-complex vitamin, has demonstrated a reduction in the transport of this molecule due to a point mutation in the threonine 91 residue of SMCT1. In the present investigation, a protein homology modeling strategy was used to generate a model of the SMCT1 transporter in an externally oriented conformation. Molecular docking to search for conformers representing the binding mode of nicotinate and related compounds of varying affinity for SMCT1, to finally apply molecular simulation methodologies to structurally characterize the key elements that regulate the uptake of these compounds, in addition to studying the effect of the threonine 91 by glycine (T91G) mutation and how this affects the transport of substrates. The results obtained throughout this research suggest that residues F65, F85, F88, Y92 and W253 are important residues in the uptake of compounds, on the other hand, residue threonine 91 presents a structural role where its mutation by glycine, which ends up causing the distortion in the side chains of Y92 and W253 produces the instability of these complexes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas cotransportadoras y su importancia: Familia SLC5.

Las proteínas de membrana constituyen por sobre el 30% del total de proteínas expresadas en el genoma humano, desempeñando un papel fundamental en muchas funciones celulares y moleculares como el transporte de sustratos, transducción de señales, reconocimiento celular, interacciones específicas ligando-receptor y adhesión celular por mencionar algunas de ellas. Estas proteínas también representan más del 60% de los actuales objetivos farmacológicos (Kang & Tullman-Ercek, 2018). Si bien, todas las membranas biológicas de las células somáticas en mamíferos están compuestas de una bicapa lipídica, su interacción con proteínas no siempre es de la misma forma (van Meer *et al.*, 2008). A raíz de ello, las proteínas de membrana pueden clasificarse principalmente según su ubicación en la bicapa lipídica, donde se asocian de tres maneras distintas a la membrana celular: (1) Proteínas de membrana ancladas a lípidos, (2) Proteínas de membrana periféricas y (3) Proteínas integrales de membrana (Harvey Lodish, 2016). Para este último grupo de proteínas, existe una clasificación aún más específica según el tipo de transporte que realicen, donde pueden distinguirse: (1) Canales de membrana, (2) Transportadores activos primarios y (3) Transportadores activos secundarios, como por ejemplo canales de potasio, bombas y cotransportadores, respectivamente (Dahl *et al.*, 2004).

En cuanto a los cotransportadores, estos se destacan por presentar principalmente un mecanismo de transporte activo secundario a través de las membranas biológicas en las células. Este mecanismo consiste en acoplar el movimiento de un ion a favor de su propio gradiente electroquímico, mientras que, a su vez se favorece el movimiento de un sustrato a favor o en contra del gradiente, presentado por el ion impulsor. Este ion es preferentemente sodio (Na^+) o hidrogeno (H^+). En el mecanismo de transporte activo secundario, la energía necesaria para realizar el transporte activo es proporcionada por el gradiente de concentración del ion impulsor, por lo que no requiere de ATP para su funcionamiento, lo cual es la principal diferencia con el transporte activo primario. En este último mecanismo, si se requiere de la hidrólisis ATP para

proporcionar la energía necesaria que permita transportar los sustratos. En este ámbito, las proteínas cotransportadoras funcionan mayoritariamente mediante dos distintos tipos de mecanismos: simporte y antiporte, donde la dirección del flujo químico es la principal diferencia entre ambos. En el primer caso, el mecanismo simporte de moléculas se realiza en la misma dirección que el ion impulsor, mientras que en el segundo caso, el mecanismo antiporte se realiza en direcciones opuestas (Busch & Saier, 2002). Existe también un tercer grupo de clasificación, llamado mecanismo uniporte, caracterizado por ser un tipo de difusión facilitada que permite transportar de a una molécula a la vez, a favor de su gradiente de concentración, logrando también mover sustratos a través de membranas biológicas, aunque de forma más lenta (Goswitz & Brooker, 2008).

Las proteínas de membrana son las principales encargadas de mediar el flujo de iones, sustratos y moléculas desde el medio extracelular al intracelular (o viceversa), por lo que poseen un rol clave para mantener la homeostasis celular de un organismo (Busch & Saier, 2002). En este aspecto, la glucosa es una molécula esencial para la mayoría de los organismos, la cual posee transportadores específicos que permiten su regulación en el cerebro conocidos como GLUT (Mueckler & Thorens, 2013). Estos transportadores responden a cambios sutiles en las concentraciones de glucosa, de modo que pequeñas variaciones pueden hacer la diferencia entre normoglucemia (valores óptimos de concentración en el plasma sanguíneo), hipoglicemia o hiperglicemia, ambas condiciones potencialmente mortales (Stanley *et al.*, 2019). Existen 3 familias principales de transportadores de glucosa en el genoma humano: (1) Transportadores facilitadores SLC2, (2) Uniportadores SLC50 y (3) Transportadores activos de glucosa SLC5 (Wright, 2013). Específicamente, la familia SLC5 se conoce como una familia de transportadores de solutos mediada por Na⁺, la cual incluye 12 miembros en el genoma humano (ver figura 1). Los transportadores SLC5 típicamente transportan pequeños solutos como azúcares, vitaminas, aminoácidos, iones, ácidos grasos de cadenas cortas y monocarboxilatos (Gyimesi *et al.*, 2020). Estas proteínas cotransportadoras se encuentran mayormente expresadas en el cerebro, riñón, intestino delgado, músculos, hígado y pulmones (Wright, 2013).

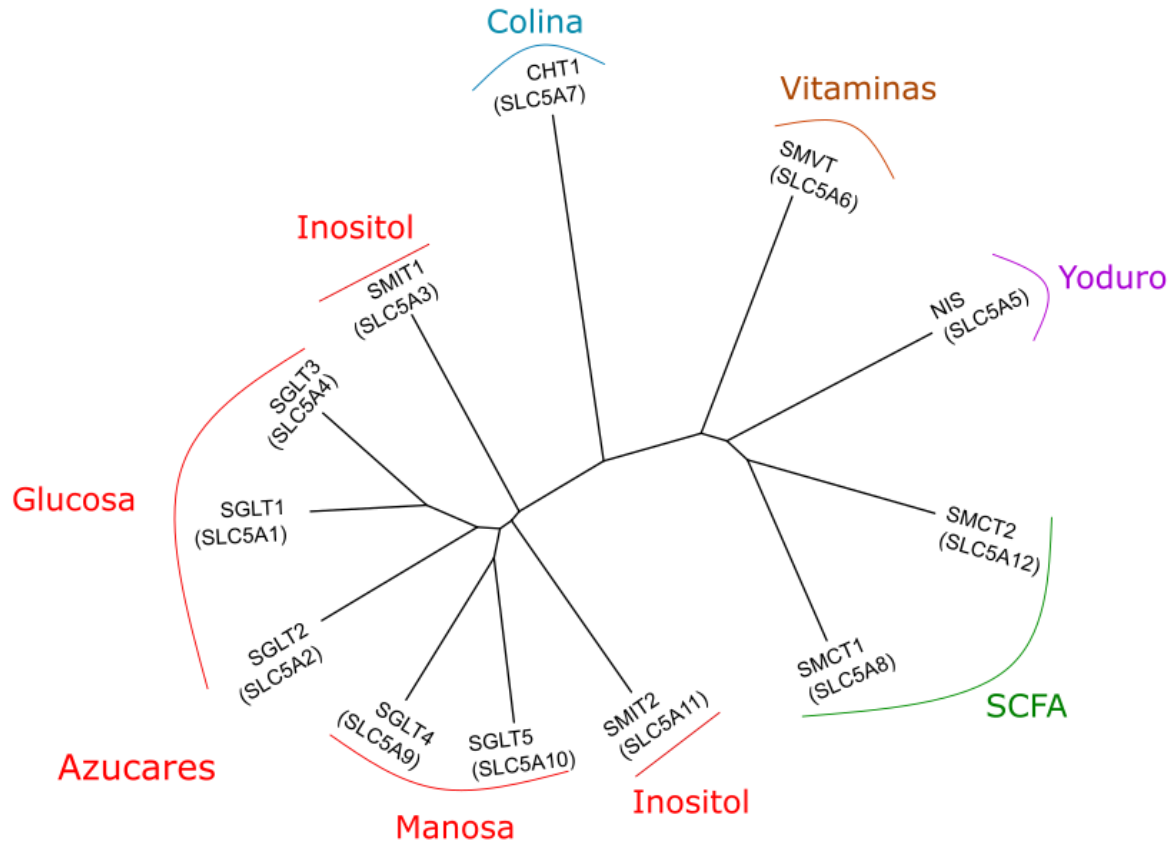


Figura 1. Árbol filogenético de la familia de transportadores dependientes de sodio SLC5. La familia de transportadores SLC5 de SCFA (del inglés, *Short-Chains Fatty Acids*) corresponde a transportadores de cadenas cortas de ácidos grasos. Los 12 genes de la familia SLC5 representados codifican proteínas de 60 a 70 kDa conteniendo entre 580 a 718 residuos aproximadamente.

A partir de distintos trabajos ya publicados para determinar una predicción sobre la estructura secundaria y segmentos transmembrana de esta familia de transportadores, se han reportado la presencia de 14 hélices transmembranales en todos los miembros de la familia SLC5, excepto en NIS (del inglés, *Sodium/Iodide Symporter*) y SMCT1 (del inglés, *Sodium-coupled Monocarboxylate Transporter*), donde ambos se caracterizan por la ausencia de la hélice transmembranal número 14 (Wright, 2013).

1.2 Transportador SMCT1: Estructura y Función.

La familia de proteínas SLC5, incluye entre sus miembros transportadores de azúcar (SGLT1-5), así como también transportadores de otros importantes sustratos, incluyendo el mioinositol (SLC5A3 y SLC5A11), yoduro (SLC5A5), monocarboxilatos (SLC5A8 y SLC5A12), colina (SLC5A7) y vitaminas (SLC5A6) (Wright, 2013) (ver Figura 1). Todas estas proteínas de membrana pertenecientes a la familia SLC5 comparten su mecanismo de transporte, el transporte activo secundario. En este caso, utilizando el gradiente electroquímico del ion Na^+ , logran captar, acoplar y/o desacoplar sustratos a células específicas (Gyimesi *et al.*, 2020). Dentro de esta familia, el transportador de monocarboxilatos SMCT1, se presenta como uno de los miembros con funciones y roles hipotéticos más interesantes de la familia SLC5. De hecho, para este transportador, se ha reportado experimentalmente su relevancia en el transporte de fármacos en el tracto intestinal en mamíferos (Gopal *et al.*, 2007), como es el caso del Ácido γ -hidroxibutírico (GHB) (Cui & Morris, 2009). Además, se ha reportado que cumple un rol central en la regulación de butirato dentro del intestino delgado, que corresponde al principal sustrato relacionado con cáncer colorrectal en humanos (CRC) (Gonçalves & Martel, 2016). En concreto, SMCT1 es un cotransportador de monocarboxilatos y cadenas cortas de ácidos grasos dependiente de Na^+ , codificado por el gen SLC5A8 (UniProtKB Q8N695 (Rodríguez *et al.*, 2002)). Originalmente, fue identificado como un transportador de butirato, que permitía inhibir la desacetilación de histonas, perfilándose con un importante rol anticancerígeno dado su función en la supresión de tumores (Gopal *et al.*, 2007). Por otro lado, en cuanto a la captación de monocarboxilatos, SMCT1 es un transportador de alta afinidad, que se expresa principalmente en tejido intestinal, riñones y en menor medida en el cerebro, retina y tiroides (Miyauchi *et al.*, 2004). El transporte de sustratos en SMCT1 es mediado por un ion Na^+ , donde muestra una estequiometría de 2:1 en cuanto a la relación $\text{Na}^+:\text{SCFA}$ (Gyimesi *et al.*, 2020). La alta afinidad de SMCT1 por monocarboxilatos se debe a su localización en la región celular distal de membranas apicales, es decir, orientada al lumen de una cavidad tubular como el intestino delgado, lo que le permite captar monocarboxilatos de manera más eficiente a concentraciones mucho más bajas (Ohkubo *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la expresión de SMCT1 está asociada a etapas iniciales de CRC, presumiendo su importancia en el tratamiento de este tipo de cáncer (Gonçalves & Martel, 2016). En pacientes de CRC se ha detectado una pérdida alélica en el cromosoma 12q, que contiene al gen SLC5A8, el que es un putativo punto de control de crecimiento y proliferación celular en tumores cancerígenos (Li *et al.*, 2003). Interesantemente, también se ha visto que en pacientes con cáncer a la tiroides, estómago, próstata y páncreas, el gen codificador de SMCT1 se encuentra silenciado (Whitman *et al.*, 2008). Actualmente, este transportador no cuenta con una estructura cristalina resuelta experimentalmente, por lo que en el año 2017, Vergara-Jaque y colaboradores (Vergara-Jaque *et al.*, 2017) construyeron un modelo por homología de SMCT1 en una conformación *inward-facing* utilizando como templatado la estructura del transportador SGLT (del inglés, *Sodium/Galactose Linked Transporter*) PDBID: 3DH4, ver figura 2 (Karpowich & Wang, 2008).

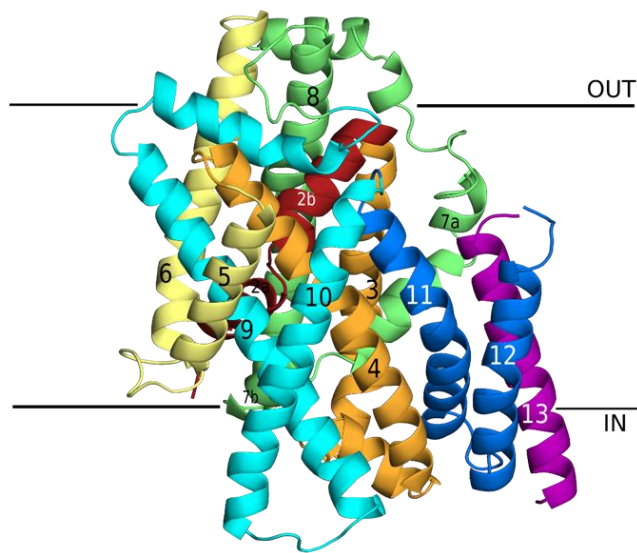


Figura 2. Modelo tridimensional por homología del transportador SMCT1. Estructura generada por Vergara-Jaque *et al.*, 2017. Este modelo utiliza como templatado la estructura del transportador de sodio/galactosa del organismo *vibrio parahemolyticus* (vSGLT), PDB ID 3DH4. Los números 1 hasta el 13 representan la numeración de las hélices transmembranales y las líneas horizontales señalan la ubicación del transportador en la membrana celular. Se utilizan distintos colores para diferenciar cada una de las hélices en la estructura.

1.3 Unión de monocarboxilatos: Nicotinato y compuestos relacionados.

La captación de monocarboxilatos en mamíferos juega un rol esencial en el funcionamiento de variados tejidos como músculo esquelético, corazón y cerebro (Stanley *et al.*, 2019). Investigaciones recientes, han señalado que el transportador SMCT1 podría estar involucrado en la captación de nicotinato, un importante monocarboxilato para el metabolismo en humanos (Ohkubo *et al.*, 2012). El nicotinato, ácido nicotínico o niacina, es una vitamina del complejo B, la cual principalmente sirve como precursor de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), ambas coenzimas conocidas como partícipes de importantes reacciones que permiten mantener los estados de oxidación al interior de las células (Said, 2004; Ohkubo *et al.*, 2012). En humanos, el nicotinato es principalmente incorporado a través de la dieta, y aproximadamente el 2% es en base a transformaciones metabólicas del aminoácido triptófano (Trp) (Schwarcz & Stone, 2017). Entre las funciones del nicotinato en humanos destaca la implicancia directa en el crecimiento y mantención del sistema nervioso central (Fricker *et al.*, 2018), y usos terapéuticos en base a nicotinamida, que actúa como sensibilizador de tumores en procesos de radiación o quimioterapia (Ruddock *et al.*, 2000; Ruddock & Hirst, 2004). Además, se debe considerar la implicancia del nicotinato en la generación de moléculas NAD, ya que, cuando existe deficiencia en su captación, se producen eventos de reparación tardía del ADN. Esto, producto de la acumulación de rompimientos de una o de dos hélices dado un incorrecto funcionamiento de las enzimas que degradan NAD*, conllevando incluso a casos de detención del ciclo celular, apoptosis irregular y predisposición al desarrollo de cáncer (He *et al.*, 2019; Nikas *et al.*, 2020). Mas aún, recientes estudios sugieren que algunos tipos de cáncer pueden usar la irregularidad en la captación de nicotinato para su beneficio. Como se muestra en la figura 3 y figura 4, SMCT1 además de tener una alta afinidad por nicotinato es capaz también de interactuar con compuestos estructuralmente similares, donde en su mayoría se encuentran análogos estructurales de nicotinato y monocarboxilatos (Gopal *et al.*, 2007). En un estudio reportado por Gopal y colaboradores en 2007, 2-picolinato y 2-pirazincarboxilato mostraron ser moléculas que se unieron con alta afinidad a SMCT1, seguidos por isonicotinato y metilnicotinato, los que en conjunto actuaban como fuertes inhibidores de

nicotinato. En base a estos experimentos surge principalmente la interrogante de ¿Cómo y dónde interactúan estos compuestos en la estructura de SMCT1 para lograr un transporte efectivo?

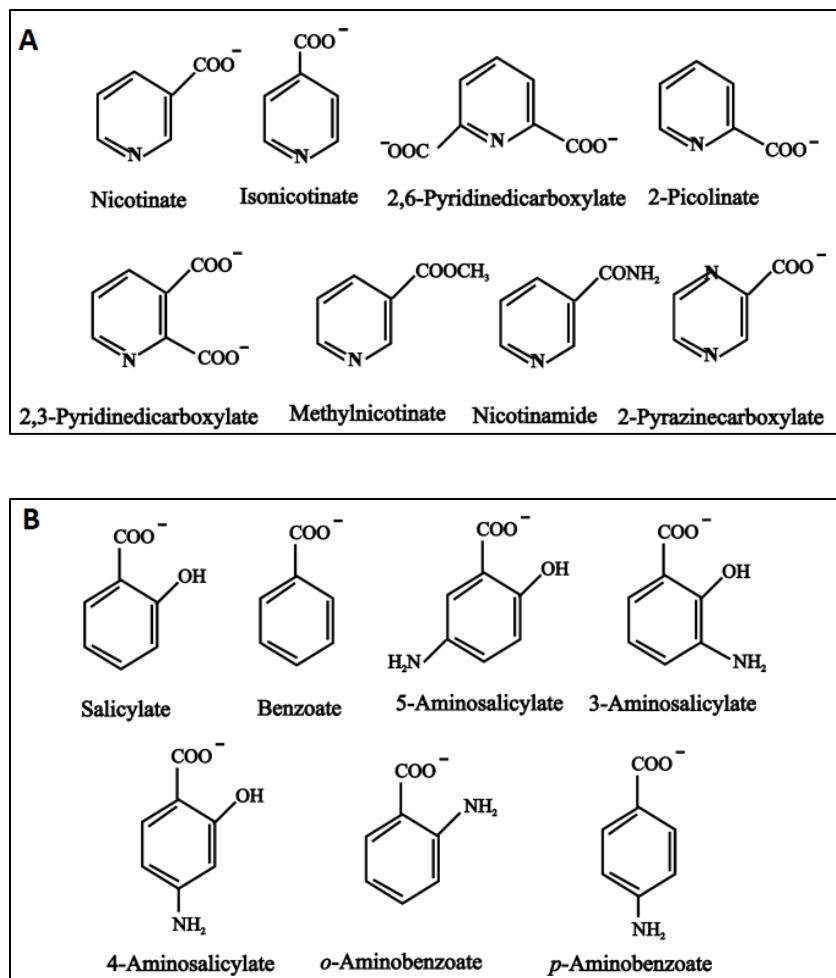


Figura 3. Estructura de nicotinato y compuestos relacionados. El conjunto de compuestos corresponde a una selección de moléculas estudiadas por Gopal et al., evaluando su unión frente a SMCT1. (A) corresponden a compuestos estructuralmente análogos a nicotinato. (B) corresponden a compuestos de tipo monocarboxilatos.

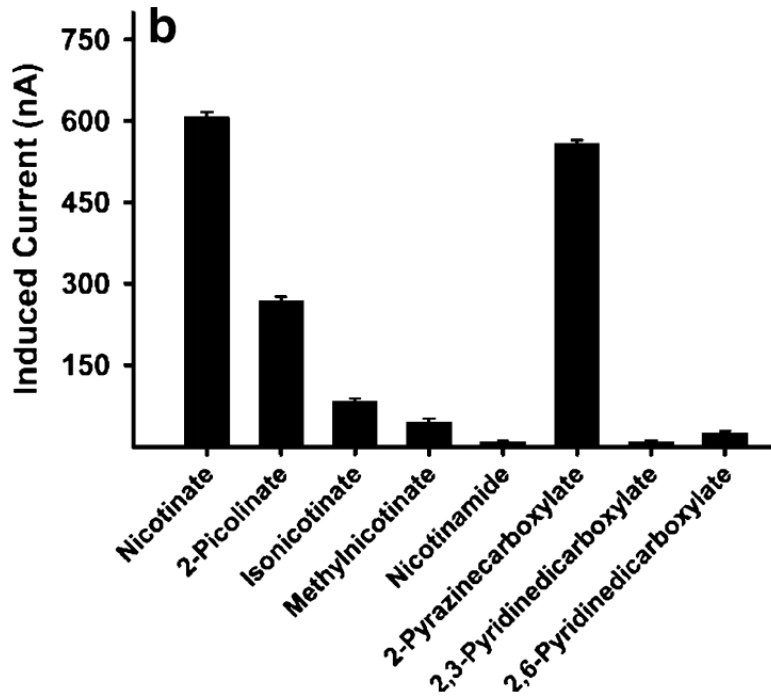


Figura 4. Transporte de nicotinato y compuestos estructuralmente relacionados mediado por SMCT1 humano. Expresión en ovocitos de *X. laevis* comparando el flujo de corriente inducida por nicotinato con *radiolabeling* de carbono 14 y compuestos relacionados (Gopal *et al.*, 2007). Las corrientes medidas son influenciadas por el potencial de membrana, donde eventos como la hiperpolarización aumentaban la magnitud de las corrientes inducidas por los compuestos, y a su vez eventos de despolarización disminuían las corrientes. Por lo tanto, Gopal y colaboradores hipotetizan una directa relación entre la corriente inducida y la capacidad del compuesto por inhibir la captación de nicotinato, permitiendo actuar competitivamente por el sitio de unión a sustrato en SMCT1.

1.4 Mutaciones que afectan la unión a sustratos en SMCT1.

A partir de investigaciones recientes, que tenían por objetivo estudiar y comprender la capacidad de algunos cotransportadores para captar el ion yoduro (I^-), Vergara-Jaque *et al.* realizaron una comparación entre dos miembros de la familia SLC5. Específicamente, se compararon los transportadores NIS (SLC5A5) y SMCT1 (SLC5A8), los cuales muestran una estrecha relación evolutiva (ver Figura 1). Pese a que NIS y SMCT1 de humano poseen funciones diferentes, ambos transportadores comparten residuos importantes que coordinan el transporte de sus respectivos sustratos. Mediante una superposición estructural entre modelos de NIS y SMCT1 se estableció la homología entre el residuo G93 de NIS, previamente asociado a

mutaciones que causan patologías severas (Paroder-Belenitsky *et al.*, 2011) con el residuo T91 de SMCT1. En base a este estudio, se planteó la siguiente interrogante: ¿La mutación de T91 podría desempeñar un rol crucial en el transporte de sustratos mediado por SMCT1? Recientes experimentos (aún no publicados), realizados por la Dra. Peking Fong (Kansas State University, USA) en colaboración con la Dra. Vergara-Jaque, identificaron que la variante T91G en SMCT1 afecta significativamente la captación de ^{14}C -nicotinato (nicotinato marcado con carbono 14), demostrando, en base a su aplicación en estudios y usos sobre métodos cuantitativos de moléculas biológicas (Niimi, 1979; Beamer & Atchison, 2002), la participación de este residuo en la unión de sustratos (ver Figura 5). Por lo tanto, en el presente estudio y como continuación de esta investigación, se propone también evaluar la unión de nicotinato en presencia de la mutante T91G en SMCT1.

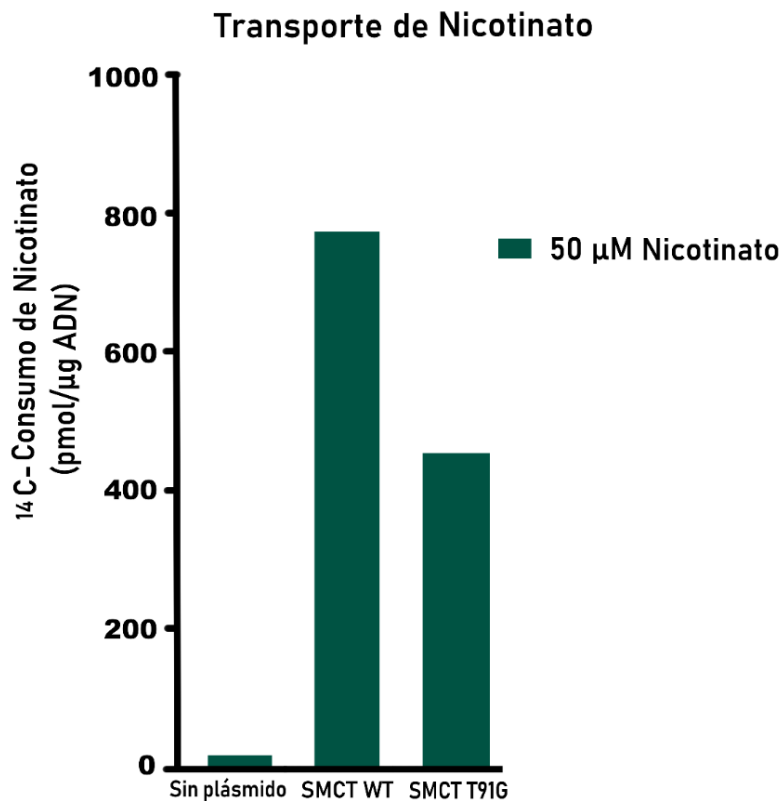


Figura 5. Transporte de nicotinato mediado por SMCT1 WT y mutado. Comparación de la captación de nicotinato radiomarcado con carbono 14 mediado por SMCT1 *wildtype* y SMCT1 con la mutación T91G. En el gráfico se aprecia que la mutación T91G no impide completamente el transporte, sino que reduce la capacidad total de nicotinato facilitado por SMCT1.

1.5 Planteamiento de investigación.

Bajo los antecedentes presentados respecto a la función biológica de SMCT1 y su posible rol como blanco farmacológico frente a CRC, a través del transporte de monocarboxilatos y cadenas cortas de ácidos grasos, es que en la presente investigación se realizó una caracterización molecular de los componentes estructurales más relevantes en la asociación de SMCT1 y diferentes sustratos. La motivación de esta investigación se centró en que aún no existe evidencia clara sobre el mecanismo específico de transporte de monocarboxilatos mediado por SMCT1, principalmente de moléculas como nicotinato y compuestos relacionados. Si bien existen modelos por homología de este transportador (Vergara-Jaque *et al.*, 2017) para realizar estudios estructurales, es posible aún continuar refinando dichos modelos con metodologías computacionales de vanguardia.

Es importante que los componentes estructurales que regulan específicamente la asociación de distintos compuestos por SMCT1 estén plenamente dilucidados, ya que, como se ha señalado anteriormente, este cotransportador posee afinidad por una amplia gama de monocarboxilatos y análogos estructurales de nicotinato. Por lo tanto, el estudio y caracterización estructural de complejos de este tipo permitirá identificar residuos claves que constituyan nuevos blancos farmacológicos para intervenir patologías asociadas a SMCT1.

2. HIPÓTESIS

Una caracterización estructural de SMCT1 interactuando con nicotinato y compuestos relacionados, así como también la descripción del efecto de la mutación T91G, permitirán determinar los residuos claves que regulan la unión de este transportador por determinados sustratos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los elementos estructurales que modulan la asociación de SMCT1 con nicotinato y compuestos relacionados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modelar la proteína SMCT1 sobre la base de una estructura templado actualizada.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular para SMCT1 interactuando con nicotinato y compuestos relacionados.
- Identificar residuos clave en la interacción de SMCT1 con nicotinato y compuestos relacionados.
- Simular la asociación de compuestos de diversa afinidad con SMCT1.
- Evaluar la unión de nicotinato con SMCT1 bajo la mutación T91G.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto de memoria de título se basa en un trabajo publicado en el año 2017, por Vergara-Jaque y colaboradores (Vergara-Jaque *et al.*, 2017), donde se construyó un modelo por homología del transportador SMCT1, con el fin de estudiar los elementos estructurales que regulan la asociación de este transportador con iodo. Sobre la base de este estudio, en la presente investigación se construyó un modelo actualizado de SMCT1 usando como templado el transportador de ácido siálico (SIAT), código PDB: 5NVA. Este nuevo modelo, se utilizó para realizar estudios de *docking* incluyendo la molécula de nicotinato y compuestos estructuralmente relacionados. Para los complejos más relevantes, se utilizó un protocolo de dinámica molecular, para entender la naturaleza de las interacciones moleculares más importantes establecidas en cada caso. Finalmente, se evaluaron los efectos de la mutación T91G en SMCT1 para estimar su rol en la unión de Nicotinato. Todos estos estudios contemplan una caracterización a nivel estructural de los complejos, con el fin de identificar residuos claves que regulen la unión entre el transportador y los compuestos seleccionados.

4.1. Modelado de la proteína SMCT1 sobre la base de una estructura templado actualizada. *Relativo al objetivo específico 1.*

Se construyó un modelo tridimensional del transportador SMCT1, mediante la metodología computacional de modelado por homología de proteínas (Er *et al.*, 2018). Esta técnica tiene como finalidad determinar computacionalmente la estructura de una proteína de interés, en base a su similitud de secuencia aminoacídica con respecto a una proteína templado. La técnica de modelado por homología surge a partir de la necesidad de estudiar la estructura tridimensional de proteínas; no obstante, su punto más importante es la capacidad de producir modelos con gran sustento teórico sin depender de costosos procedimientos experimentales como difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear (Waterhouse *et al.*, 2018).

4.1.1. Modelado por homología de SMCT1

A través de la base de datos UniProt (Consortium, 2019) se obtuvo la secuencia aminoacídica de SMCT1, de código UniProtKB Q8N695 (Rodríguez *et al.*, 2002). Posteriormente, se buscaron las estructuras templado usando Psi-Blast versión 2.10.1 (Altschul *et al.*, 1990) contra la base de datos no redundante *Protein Data Bank* (PDB) (Bagheri *et al.*, 2021). Para apoyar la búsqueda de templados, se utilizó también el servidor web i-TASSER (Roy *et al.*, 2010), el cual permite la búsqueda automatizada de proteínas homólogas y la generación de modelos por homología. A través de estos servidores, se identificó como templado el transportador de ácido siálico (SIAT), código PDB: 5NVA. Esta proteína fue resuelta previamente mediante cristalografía de rayos X y depositada en la base de datos PDB (Venselaar *et al.*, 2010). Como requisito para el modelado por homología, se generó un alineamiento secuencias entre las proteínas *target* y templado usando el servidor ALIGN-ME (Stamm *et al.*, 2014), desarrollado con especial énfasis en la construcción de alineamientos de proteínas de membrana. A este alineamiento se incorporaron predicciones de estructura secundaria obtenidas con PSIPRED (Buchan & Jones, 2019) y predicciones de segmentos transmembranales obtenidas con la plataforma web TOPCONS (Tsirigos *et al.*, 2015) (ver Figura 6). Siat comparte un 23% de identidad secuencia con SMCT1. En bacterias, Siat cumple un rol fundamental dando la capacidad de incorporar ácido siálico como fuente de carbono, nitrógeno y energía principalmente (Wahlgren *et al.*, 2018).

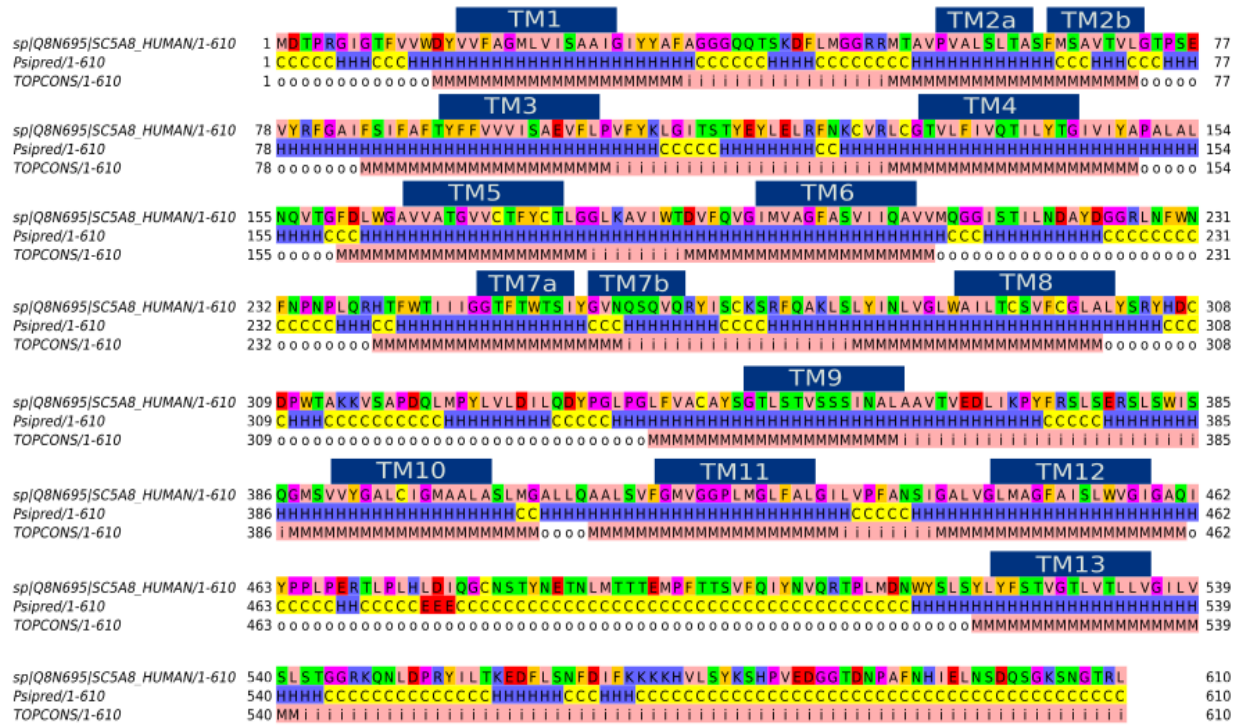


Figura 6. Análisis de predicción de estructura secundaria (PSIPRED) y segmentos transmembranales (TOPCONS) para SMCT1. Los análisis de predicción fueron realizados con los servidores web TOPCONS Y PSIPRED. Para visualizar las secuencias se utilizó Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). La estructura secundaria de SMCT1 contiene 13 alfa hélices transmembranales a diferencia de las 14 observadas en otros transportadores miembros de la familia SLC5.

El alineamiento resultante entre las secuencias de las proteínas *target* y templado se utilizó como *input* en el software de modelado MODELLER (Eswar *et al.*, 2006^a), el cual implementa restricciones espaciales para el modelado comparativo de proteínas (Sali & Blundell, 1993). Este *software* además ofrece otros servicios tales como: modelado *de Novo* de *loops*, optimización de modelos estructurales, alineamiento múltiple de estructuras para *clustering*, etc. MODELLER v10.1 se utilizó para generar el modelo por homología del transportador SMCT1, a partir de la estructura de la proteína Siat y el alineamiento de secuencias descrito anteriormente.

4.1.2 Evaluación de la calidad del Modelo de SMCT1.

A partir de un amplio conjunto de modelos generados con MODELLER (2.000 modelos), se seleccionó la estructura con mejor puntuación energética según la función de puntuación estándar de MODELLER, Molpdf (Eswar *et al.*, 2006b). Se utilizaron también otros predictores que incorporan potenciales estadísticos para evaluar la calidad de los modelos, incluyendo PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) y ProQM (Ray *et al.*, 2010). PROCHECK estima la calidad estereoquímica por cada residuo, empleando gráficos de Ramachandran para verificar si éstos se encuentran en regiones de conformaciones permitidas. Por su parte, ProQM es un programa de evaluación de la calidad del modelo, el que utiliza métodos basados en aprendizaje profundo como *support vector machine*, además de otros parámetros específicos para determinar la calidad de estructuras de proteínas transmembranales (Wallner, 2014).

4.2. Estudios de acoplamiento molecular para SMCT1 interactuando con nicotinato y compuestos relacionados. *Relativo al objetivo específico 2.*

Con el propósito de buscar conformaciones favorecidas para los complejos conformados por SMCT1, nicotinato y compuestos relacionados, se realizaron estudios de acoplamiento o *docking* molecular. En términos de esta investigación, el *docking* realizado, permitió posicionar las moléculas pequeñas (ligandos) dentro del sitio de unión a ligando en el modelo de la proteína SMCT1 (Pinzi & Rastelli, 2019), para así luego simular computacionalmente la interacción molecular de complejos representativos.

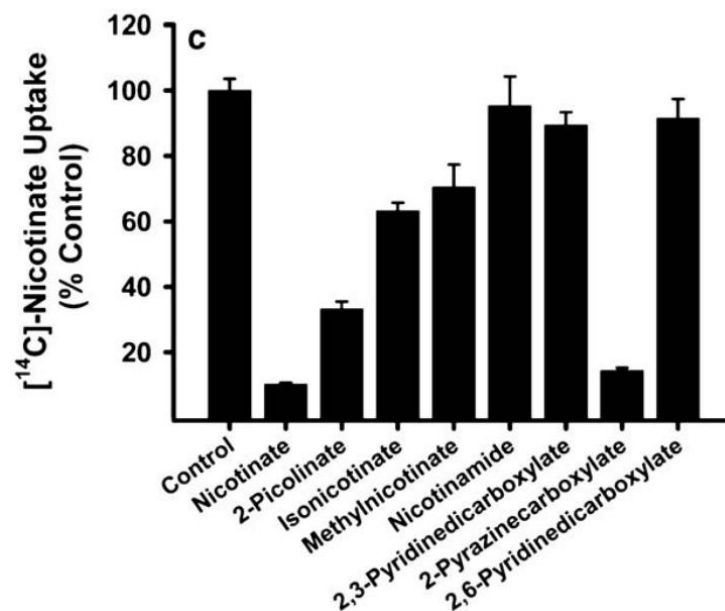


Figura 7. Recaptación de nicotinato con radio marcaje de carbono 14 en presencia de nicotinato sin radio marcaje, análogos estructurales de nicotinato y monocarboxilatos. A través de este gráfico es posible reconocer como compuesto con capacidad inhibitoria al análogo estructural 2-picolinato, el cual inhibe hasta un 65% la recaptación de 14C-nicotinato. En contraparte metilnicotinato exhibe un comportamiento como inhibidor de hasta el 25%, reconociendo a este como un competidor más débil que 2-picolinato, pero con capacidad competitiva por el sitio de unión a sustrato de SMCT1 como para aportar a un análisis comparativo. En consideración que, nicotinato presenta una capacidad representada por un 90% de recaptación con respecto a 14C-nicotinato, el enfoque de estudio estará alrededor de metilnicotinato y este último.

4.2.1. Obtención de la estructura de nicotinato y compuestos relacionados.

Diferentes compuestos descritos en el artículo de Gopal y colaboradores en 2007 fueron seleccionados para el *docking* molecular (ver figura 4). En base a estos compuestos, se construyó una representación computacional correspondiente a cada estructura. Para ello, se utilizó el servidor web Molview (Smith, 1995). Este programa permitió la obtención de las estructuras tridimensionales de los compuestos.

4.2.2. Caracterización fisicoquímica de los compuestos.

El estado de protonación a pH 7.4 de cada compuesto fue calculado utilizando MarvinSketch 21.3.2. Este software incorpora parámetros fisicoquímicos calculados empíricamente (principalmente cargas parciales de Mulliken). MarvinSketch se eligió debido a los buenos resultados en estudios recientes comparando métodos experimentales y computacionales para el cálculo de pKa (Tutone et al., 2016). Para el cálculo de estados de protonación, se utilizaron las estructuras neutras de cada compuesto, luego se calculó el estado de protonación mediante el pKa y además se confirmó este estudio mediante el cálculo del coeficiente de distribución logD. Este coeficiente describe una distribución estadística de todas las formas de un compuesto a un pH específico. A diferencia del coeficiente de partición logP, que es independiente del pH, logD cambia con el pH a medida que se desplaza la fracción de cada micro-especie, lo que altera la proporción de moléculas ionizadas (Landry & Crawford, 2020). Por lo tanto, logD se utiliza para proporcionar una medida de la lipofilia de los compuestos ionizables. En esta caracterización se utilizaron los siguientes parámetros:

A través de este cálculo se logró ver todos los posibles estados de protonación de los compuestos. Debido a que los compuestos tienen más de un átomo ionizable, se efectuó una evaluación multiprótica. Conjuntamente se aplicó el cálculo estático que realizó la valoración partiendo de la molécula neutra. Los estados de protonación se calcularon considerando la forma tautomérica y de este modo se obtuvieron los estados de protonación de la especie principal en los casos en que aplicaba. A partir de estos datos, se escogieron las estructuras con poblaciones más representativas a pH 7.4 .

4.2.3 Acoplamiento molecular de los compuestos (*Docking*).

Para llevar a cabo los ensayos de acoplamiento molecular, se utilizó el software Glide 2018-4, contenido en el paquete Schrodinger (Halgren *et al.*, 2004), el cual permite implementar una serie de filtros jerárquicos para buscar las orientaciones relativas de un ligando en relación a su receptor. Dichos filtros se pueden enumerar como: (1) Búsqueda sitio dirigida, (2) Prueba por diámetro, (3) Prueba por subgrupos, (4) Asignación puntaje inicial, (5) Refinamiento, (6)

Minimización de la grilla y aplicación del algoritmo de Monte Carlo, (7) Asignación puntaje final. Inicialmente, Glide genera un esquema de puntajes tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas inherentes a la estructura de cada ligando. Posteriormente, se puede construir un conjunto de grillas, representadas por puntos definidos en el espacio tridimensional para acotar la búsqueda de una orientación favorecida por cada complejo a estudiar. A partir de estas conformaciones, se explora el espacio acotado por cada grilla de búsqueda anteriormente definida, permitiendo refinar las posiciones iniciales de cada conformero por ligando. A través de este preprocesamiento, se reduce la dimensionalidad del problema, permitiendo mejorar los tiempos de cálculo para obtener complejos proteína:ligando más rápidamente. De esta forma se evita el uso de métodos estocásticos en la búsqueda de conformaciones iniciales (Friesner *et al.*, 2004a). Las poses resultantes de Glide, se sometieron a métodos de minimización de energía ocupando el campo de fuerza OPLS-AA (Jorgensen *et al.*, 1996). Finalmente, Glide selecciona las conformaciones de menor energía basándose en el algoritmo de Monte Carlo (Kroese *et al.*, 2014). Este método se enfoca en examinar cambios de torsión en los mínimos energéticos para asegurar la óptima orientación de las cadenas laterales del receptor y los grupos funcionales de los ligandos. Considerando los compuestos estudiados por Gopal y colaboradores (Gopal *et al.*, 2007), se optimizaron las estructuras de los ligandos, mediante el módulo “*Receptor grid generation*”. Se definió una grilla tridimensional del sitio de unión a sustratos en el modelo de SMCT1 para delimitar la zona de búsqueda conformacional por cada ligando con respecto a los residuos a menos de 10 angstroms del residuo T91 (es decir, F65, F85, F88, T91, Y92, W253 y Y257). Para la implementación de esta metodología de acoplamiento molecular, se utilizó la estructura completa de SMCT1, pero la búsqueda de conformeros fue arbitrariamente acotada a los residuos previamente identificados como el sitio de unión a sustratos.

4.2.4 Selección de compuestos para la caracterización de los sistemas proteína:ligando.

Glide emplea dos formas de puntuación para clasificar complejos proteína:ligando: (1) GlideScore SP, que hace referencia a *Standard-Precision* Glide; y (2) GlideScore XP que incluye *Extra-Precision*. GlideScore SP corresponde a una función de puntuación simplificada para la identificación de ligandos que tienen una propensión razonable para unirse a un receptor. Esta

versión busca minimizar falsos negativos y es apropiada cuando se tienen grandes librerías de ligandos. Por otro lado, GlideScore XP es una función más estricta que GlideScoreSP, ya que, impone sanciones de puntuación por poses que infringen los principios fisicoquímicos establecidos (Friesner *et al.*, 2004a). En el presente estudio, se utilizaron los valores energéticos de las poses obtenidas con GlideScore XP, debido a la rigurosidad que caracteriza a este método en sus estimaciones. Por cada ligando, se identificaron los átomos de torsión mediante el módulo “*Rotatable groups*” incluido en Glide (Friesner *et al.*, 2004b). Los ligandos se prepararon con el módulo, “*Ligand Docking*”, usando los parámetros por defecto para la búsqueda de confórmeros. Para la configuración de la grilla en donde se acoto la búsqueda conformacional, se seleccionaron como centroides los residuos del sitio de unión establecido para SMCT1. Con el módulo de Glide, “*Docking*” se realizó el acoplamiento proteína:ligando en cada caso para definir finalmente las mejores conformaciones obtenidas a partir de *docking* a través del sistema de puntuación GlideScore XP.

4.3 Identificación de residuos claves en la interacción de SMCT1 con nicotinato y compuestos relacionados. *Relativo al objetivo específico 3.*

Con el fin de identificar y acotar los residuos que tienen un rol importante en la recaptación de compuestos por parte de SMCT1, se utilizó el módulo “*Ligand interaction diagram*”, para generar diagramas del confórmero de menor energía de cada ligando estudiado, y así apoyar los estudios de acoplamiento molecular debido a la gran similitud estructural que presentan los ligandos. Finalmente, a través de un estudio comparativo de todos los complejos estudiados por *docking* se identificaron los residuos más prevalentes en las interacciones SMCT1-sustrato.

4.4. Estudios de simulación molecular de la asociación de compuestos de diversa afinidad con SMCT1. *Relativo al objetivo específico 4.*

Para simular las interacciones específicas que establece el transportador SMCT1 con determinados ligandos, se utilizó simulación de dinámica molecular clásica (SDMC) dado su excelente desempeño en el estudio de sistemas moleculares. Esta técnica, permite estudiar con

gran detalle proteínas localizadas en membrana plasmática, por su gran capacidad en recrear todo su contexto biológico circundante. En esta investigación, se utilizó SDMC para estudiar el comportamiento y el modo de unión específico de nicotinato y metilnicotinato compuestos análogos estructuralmente, en interacción con el transportador SMCT1. Se utilizaron escalas de tiempo del orden de nanosegundos (10e-9s) para evaluar interacciones relevantes en el proceso de asociación proteína:ligando (Moore *et al.*, 2001).

4.4.1 Simulación de dinámica molecular.

La dinámica molecular utiliza las ecuaciones de movimiento de Newton para simular computacionalmente la evolución en el tiempo de un conjunto de átomos que interactúan entre sí. Esta técnica depende de un campo de fuerza que describa cada uno de los movimientos de los componentes atómicos del sistema como vibraciones de enlaces, rotaciones de ángulos, diedros, vibraciones fuera del plano de enlaces, entre otros (ver Figura 8) (Mori *et al.*, 2016).

$$E_{total} = \underbrace{\sum K_r (r - r_{eq})^2}_{\text{Enlaces}} + \underbrace{\sum K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2}_{\text{Ángulos}} + \underbrace{\sum \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]}_{\text{Diedros}} + \underbrace{\sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]}_{\text{Van der Waals, Iónico}}$$

Figura 8. Ecuación de la función de energía potencial utilizada para aproximar fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular. Las fuerzas atómicas se pueden dividir principalmente en interacciones enlazantes y no enlazantes.

Existe una amplia variedad de campos de fuerza para el estudio de sistemas biológicos, tales como CHARMM (Vanommeslaeghe *et al.*, 2012), AMBER (Wang *et al.*, 2004), GROMOS (Oostenbrink *et al.*, 2004), OPLS (Jorgensen *et al.*, 1996), entre otros. Estos campos difieren entre sí, principalmente en la forma que describen los distintos potenciales interatómicos, es decir, la implementación de valores referenciales provenientes de ensayos experimentales. Los campos de fuerza también pueden tener distintos propósitos, ya sea para describir simulaciones de mecánica cuántica (QM), mecánica molecular (MM), métodos combinados (QM/MM) y de grano

grueso (*Coarse Grained*) (Loco *et al.*, 2019). En esta investigación, se utilizó específicamente el campo de fuerza CHARMM36, ya que es altamente específico para moléculas biológicas como proteínas, bicapas lipídicas y pequeñas moléculas orgánicas (Sajadi & Rowley, 2018). Para realizar las simulaciones moleculares se utilizó el *software* NAMD CUDA v2.13 (Phillips *et al.*, 2020). En detalle, NAMD es un *software* de dinámica molecular paralelizable, capaz de utilizar unidades de procesamiento gráfico (GPUs) y lógico (CPUs) para mejorar el rendimiento de los cálculos. A pesar de que actualmente sólo se utilice cerca del 30% de la capacidad de procesamiento gráfico, NAMD ha demostrado ser uno de los softwares de simulación molecular más robustos para el estudio de sistemas biológicos en general.

4.4.2 Construcción de los sistemas para simulaciones de dinámica molecular.

Para llevar a cabo simulaciones de dinámicas molecular, es necesario replicar el contexto biológico en el cual el transportador SMCT1 desempeña su rol en las células. Los complejos SMCT1:ligando seleccionados fueron embebidos en membranas lipídicas POPC (del inglés, *palmitoil oleoil fosfatidilcolin*), para luego ser solvatados con aguas explícitas tipo TIP3P, replicando el sistema en un contexto de condiciones periódicas de borde. Posteriormente, se agregó una concentración salina de 0.15 NaCl con el fin de neutralizar el sistema completo. Los compuestos seleccionados para SDMC, es decir, nicotinato y metilnicotinato, se parametrizaron mediante el servidor web ParamChem (Vanommeslaeghe & MacKerell, 2012), creando archivos de topología y parámetros en base al campo de fuerza CHARMM36 (Vanommeslaeghe *et al.*, 2012).

4.4.3 Construcción de la mutante T91G.

Con el fin de ahondar en el estudio de la mutación T91G propuesta por la Dra. Peying Fong (Kansas State University, USA) en colaboración con la Dra. Vergara-Jaque, se modificó el residuo treonina 91 por glicina (mutante T91G) en la estructura del transportador SMCT1 usando el plugin mutator en el software VMD (Humphrey *et al.*, 1996). Posteriormente, se aplicó el mismo protocolo señalado en el inciso 4.4.2 para la construcción de los sistemas.

4.4.4 Implementación para simulaciones de dinámica molecular.

Los sistemas descritos anteriormente en la sección 4.4.2 y 4.4.3, fueron minimizados a través del software NAMD. Se realizaron 50.000 pasos de minimización, mediante el algoritmo de gradiente conjugado, configurado por defecto en NAMD. Se utilizó un ensemble isotérmico-isobárico (NPT) para representar los sistemas proteína:ligando (wild type y mutado). Los sistemas construidos se equilibraron gradualmente, mediante el uso de restricciones armónicas a los carbonos alfa de la proteína (Shen *et al.*, 2015). Se aplicaron restricciones armónicas desde 50 a 0 kcal/mol, las cuales fueron reducidas de forma gradual en los primeros 10 ns de SDMC, evitando distorsiones en las cadenas laterales de la proteína, su esqueleto peptídico y átomos correspondientes al ligando.

Debido a la pequeña estructura química correspondiente al nicotinato y sus análogos, se aplicó una metodología basada en variables colectivas (Colvars) implementadas en NAMD, con el propósito de restringir los grados de libertad de los ligandos en el bolsillo de interacción de SMCT1. Para ello, se aplicaron fuerzas graduales de 50, 5 y 0.5 kcal/mol hasta liberar completamente cada sistema. El sistema bajo cada restricción Colvars se simuló computacionalmente durante 50 ns, posterior a la etapa inicial de restricciones armónicas.

La producción de datos correspondientes a los últimos 200 ns (4 etapas de 50 ns) fueron utilizadas para caracterizar las principales interacciones de los sistemas en estudio. Se utilizó un ensemble NPT en las simulaciones realizadas con el propósito de determinar cómo cambia la energía interna del sistema a una temperatura y presión constante. A través del termostato y barostato de Langevin se mantuvo la temperatura a 300° K y la presión a 1 atmósfera (Feller *et al.*, 1995). Para las interacciones de van der Waals y las electrostáticas de corto alcance se utilizó un *cutoff* entre 8-9 Å. Las fuerzas electrostáticas de largo alcance se determinaron a través del método de adición Particle-Mesh Ewald (Essmann *et al.*, 1995). Se utilizó un *timestep* de 4 femtosegundos (10e-15s) como pasos de integración de tiempo para calcular el movimiento del sistema durante la simulación. Para lograr este paso de integración, se implementó la técnica de

repartición de masas entre cada átomo pesado enlazado covalentemente a un hidrógeno, lo que permitió explorar tiempos más altos de simulación molecular (Balusek *et al.*, 2019).

4.5. Evaluación de la unión de nicotinato con SMCT1 wildtype y bajo la mutación T91G.

Relativo al objetivo específico 5.

El análisis de estructuras proteicas permite la identificación de características y funciones de interés. Una descripción a nivel estructural de un sistema es fundamental para entender el rol de residuos que determinan el sitio de unión de ligando. Un análisis de las trayectorias de dinámicas de simulación molecular permite una descripción en el tiempo, capaz de enfocarse en cambios estructurales de sitio de unión a ligando en base a las características fisicoquímicas de los residuos implicados (Henrich *et al.*, 2010).

4.5.1 Análisis de RMSD.

La desviación media cuadrática (RMSD) permite calcular la divergencia entre 2 estructuras superpuestas, por lo que entre menor sea el valor, mayor será la similitud entre ambas. Los valores de RMSD se presentan en angstroms (Å) y se calculan mediante la ecuación (1):

$$(1) \quad RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i^2}$$

donde el promedio se realiza sobre los n pares de átomos equivalentes. d_i^2 es la distancia entre los dos átomos del i -ésimo par. El RMSD se puede calcular para cualquier tipo y subconjunto de átomos, por ejemplo, átomos de C α de toda la proteína, átomos de C α de todos los residuos en un subconjunto específico, entre otros. Los cálculos de RMSD se efectuaron sobre los últimos 50 ns de simulación. Para la proteína el cálculo se efectuó sobre los átomos de carbono de la cadena principal, mientras que para los ligandos se consideraron todos los átomos de las moléculas, exceptuando los átomos de hidrógeno.

4.5.2 Alineamientos estructurales de los sitios de unión a ligando.

El alineamiento estructural es una técnica que mediante la homología entre dos o más moléculas compara sus características tridimensionales para buscar similitudes y diferencias. Para proteínas, usualmente se comparan los mismos niveles estructurales, que son principalmente la estructura secundaria y terciaria. El alineamiento estructural es una herramienta poderosa, que permite comparar proteínas con baja similitud de secuencia en donde su relación evolutiva permanece implícita en su estructura. Se generaron alineamientos estructurales para estudiar cómo cambia el sitio de unión a ligando en la proteína con relación a cada uno de los compuestos en estudio. De esta forma, se evaluó el reordenamiento estructural del sitio de unión a ligando en SMCT1 producto de la mutación T91G.

4.5.3 Análisis de distancias entre el ligando, residuos putativos y átomos específicos.

Debido a que los sistemas biológicos se encuentran descritos a nivel atomístico, en donde se emplean campos de fuerza incapaces de describir la formación o el rompimiento de enlaces, es pertinente inferir la existencia de interacciones en relación con la distancia promedio a lo largo de una simulación de dinámica molecular. En las simulaciones, se efectuó el cálculo de las distancias entre átomos específicos del ligando y las cadenas laterales de los residuos F65, F85, F88, T91/G91, Y92, W253, Y257, que forman el sitio de unión a ligando. Así también, se calculó las distancias entre los átomos específicos de los residuos F65, F85, F88, T91/G91, Y92, W253, Y257, que putativamente influyen en el sitio de unión a ligandos, ejerciendo un rol estructural.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Modelado de la proteína SMCT1 sobre la base de una estructura templado actualizada.

5.1.1 Modelado por homología de SMCT1

Para el modelado de SMCT1, como estructura templado se escogió el cotransportador mediado por sodio de ácido siálico (SIAT) PDBID: 5NVA en una conformación orientada al medio externo. La resolución del cristal fue de 2.26 Å, con un largo de 496 aminoácidos y algunos segmentos faltantes en la estructura correspondiente a los intervalos 1-4, 399-408 y 487-496. La identidad de secuencia entre SMCT1 (blanco) y SIAT (templado) fue de 28,26% y la cobertura de secuencia fue de 71%. La estructura final de SMCT1 se acotó desde sus 610 aminoácidos originales a 484 aminoácidos, seleccionados en base al alineamiento de secuencias entre SIAT y SMCT1 (ver Figura 9). De los segmentos faltantes de la estructura templado solo se modeló el segmento entre los aminoácidos 399 a 408, mediante la librería *automodel* de MODELLER. La estructura del transportador SMCT1 fue modelada utilizando el software MODELLER, con el cual se construyeron 2000 modelos conteniendo 484 aminoácidos. La selección del mejor modelo predicho por este software se realizó en base a la función de puntuación estándar de MODELLER, Molpdf el que asigna un valor a cada modelo en base a la energía total y las infracciones de restricciones estereoquímicas, por lo que entre más bajo sea el valor, mejor será la calidad del modelo. El score obtenido para el modelo fue de 2588.85. Además, se verificó que el modelo cumpliera con las predicciones de estructura secundaria y topología de proteínas de membrana realizadas con PSIPRED (Buchan & Jones, 2019) y TOPCONS (Tsirigos *et al.*, 2015), respectivamente (figura 9).

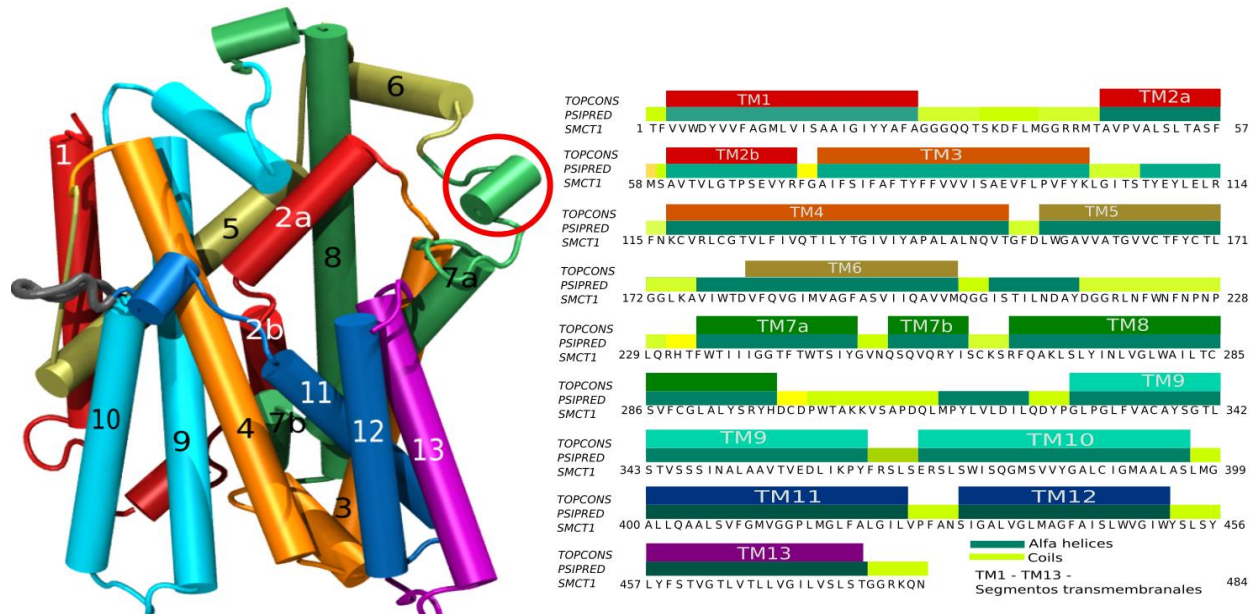


Figura 9: Modelo molecular de la estructura del transportador SMCT1 generado mediante modelado por homología. (A) Representación *cartoon* de la estructura del transportador SMCT1. Se añadió el segmento faltante de la proteína que comprende el *loop* entre los residuos 399-408 (gris). Además, es posible apreciar la estructura encerrada en la circunferencia de color rojo como la zona de más baja puntuación del modelo. **(B)** Predicciones de estructura secundaria y segmentos transmembranales para la secuencia de SMCT1 acotada a 484 residuos. Se aprecian 13 segmentos transmembranales (TMs) predicción por TOPCONS, lo que corrobora la topología mencionada en la figura 6 predicha para la secuencia completa. Las predicciones de estructura secundaria fueron realizadas con PSIPRED.

4.1.2 Evaluación de la calidad del Modelo de SMCT1.

Existen una serie de herramientas que ayudan a evaluar la fiabilidad de un modelo estructural; sin embargo, estos métodos predictivos tienden a mostrar resultados de más baja calidad al momento de evaluar proteínas de membrana. Esto se debe a que, durante la parametrización de dichas proteínas, las propiedades hidrofóbicas que confiere la bicapa lipídica no son consideradas. Con el fin de comprobar los resultados obtenidos por MODELLER, se utilizaron dos programas de evaluación de modelos, ProQM (Ray *et al.*, 2010) y PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Los puntajes de ProQM pueden variar de 0 a 1. Típicamente las estructuras con un puntaje por sobre ~ 0.7 pueden clasificarse como proteínas de membrana de calidad óptima. El modelo seleccionado obtuvo una puntuación global de 0.687. Cabe señalar que los modelos muestran una región de baja calidad que se debe a un *loop* situado en el medio

extracelular que comprende desde el residuo 220 al 242 (Figura 10). Dichas regiones no afectan el correcto funcionamiento del transportador, debido a que los residuos claves implicados en la unión del sustrato están situados en la región transmembrana de la proteína. Específicamente, los residuos descritos como claves para la unión de sustrato fueron: F65, F85, F88, T91, Y92, W253 y Y257, los cuales poseen puntajes de 0.914051, 0.793146, 0.74645, 0.84482, 0.895527, 0.997136 y 0.987412 respectivamente, validando la calidad estructural del modelo seleccionado.

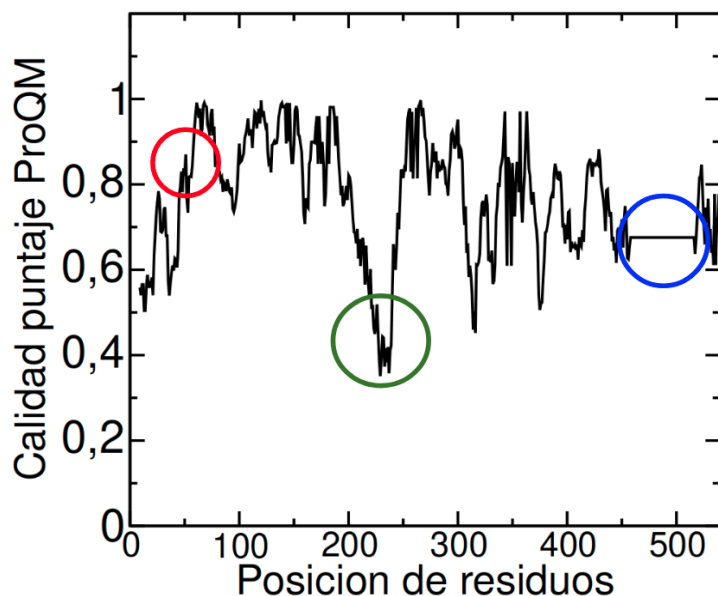


Figura 10: La predicción muestra que los residuos que componen el sitio putativo de unión a ligando poseen puntajes por sobre los 0.7 de *score* ProQM. Además, es posible apreciar el corte generado durante el modelado entre los residuos 452 - 510. Encerrado en circunferencia de color rojo se muestran los residuos del sitio de unión a ligandos, en color verde el loop comprendido entre los residuos 220 a 242 y en color azul el corte no modelado, en donde según la figura 6 corresponde a un loop entre las regiones transmembranales 12 y 13.

Sumado a los análisis anteriores, para validar la estructura seleccionada se realizó también un análisis del modelo utilizando PROCHECK. Este software evalúa el grado de consistencia del modelo comparando con estructuras proteicas conocidas en términos de distancias de enlace, ángulos, diedros y átomos superpuestos. El análisis mostró que el 98.4% de los residuos de SMCT1 (modelo con 484 residuos) se encontraban en regiones estereoquímicamente permitidas según el gráfico de Ramachandran generado (Figura 11).

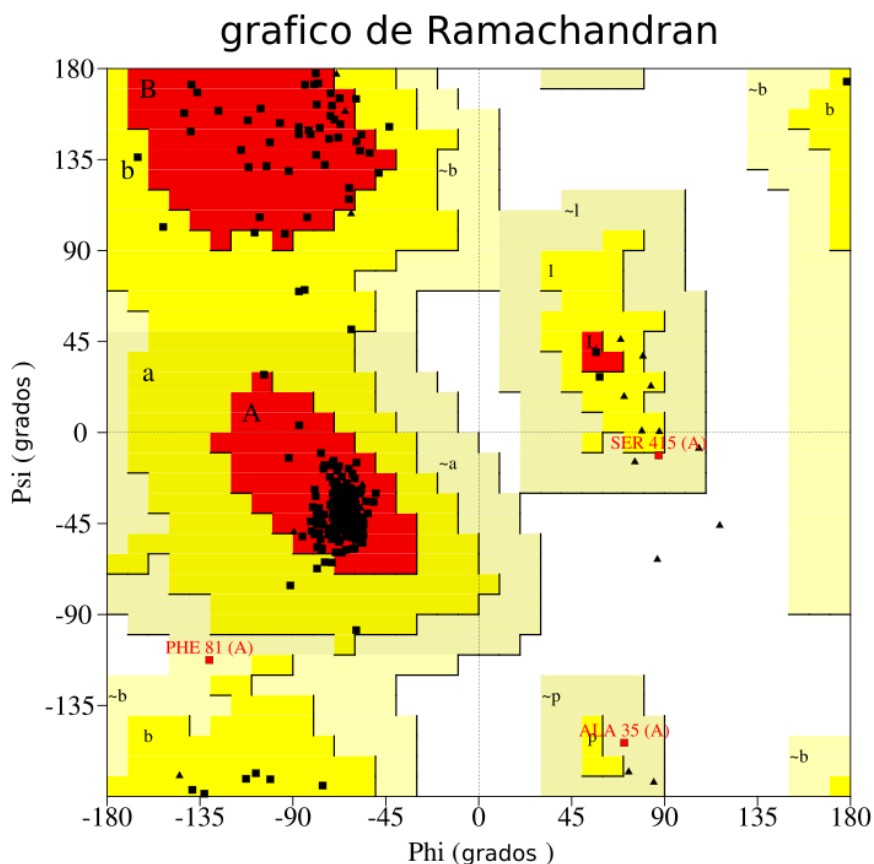


Figura 11: Se aprecia que solo tres residuos se encuentran en regiones desfavorables según su estereoquímica, estos son F81, A35 y S415 los cuales se encuentran ubicados en *loops* alejados de la zona de interés de la proteína y por ende no afectan su funcionalidad.

5.2 Estudios de acoplamiento molecular para SMCT1 interactuando con nicotinato y compuestos relacionados.

5.2.1 Verificación de estructuras para ligandos.

Siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.2.2, se realizó la selección de la estructura más representativa para cada compuesto estudiado. En la figura 13A se muestran los porcentajes obtenidos de las poblaciones protonadas y desprotonadas de cada compuesto a pH fisiológico 7.4, donde se observa un porcentaje de 99,97% para nicotinato. En su mayoría todos los compuestos se encuentran por sobre el 99% de la distribución de micro especies sobre sólo una conformación recurrente, a excepción de 5-aminosalicilato con 97%, 2,3-piridinedicarboxilato con 95% para la estructura protonada más representativa. En la figura 13B los datos sugieren que nicotinato y compuestos relacionados tienen una alta solubilidad acuosa y una baja lipofilia, debido a que existen principalmente en sus formas ionizadas a pH 7.4.

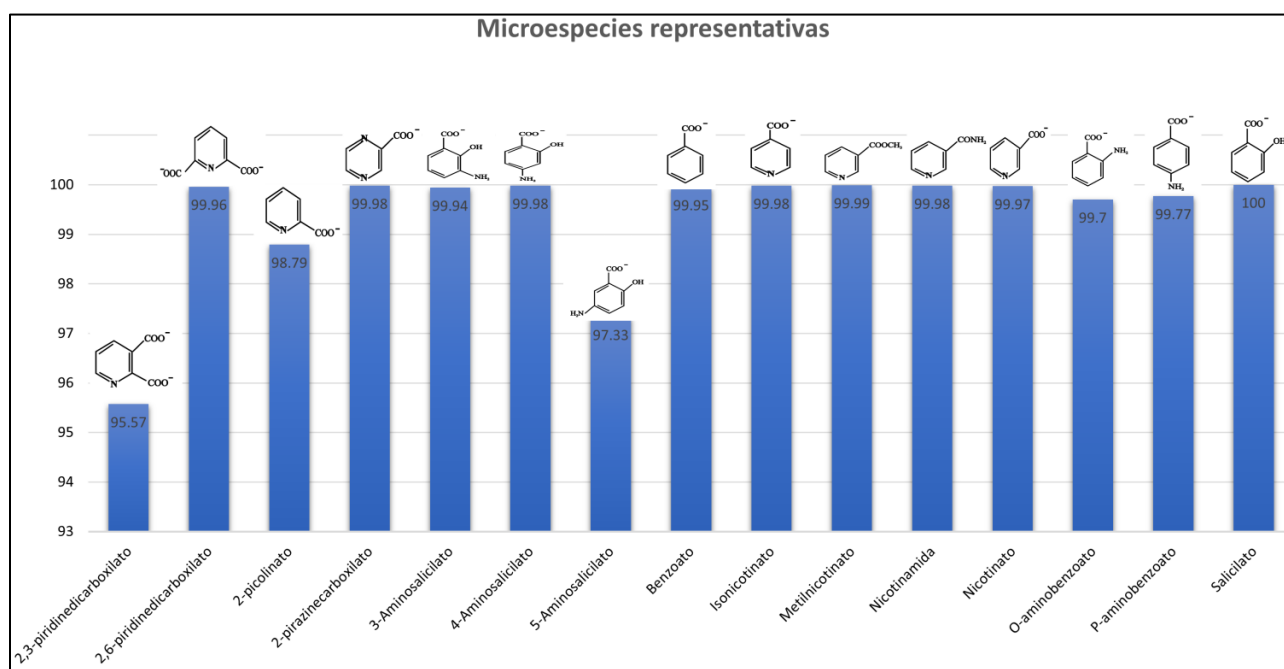


Figura 13.(A) Población de los estados de protonación para cada compuesto estudiado. Se obtuvo la distribución de estructuras protonadas posibles para los compuestos en solución a pH 7.4. Se muestra la estructura con mayor frecuencia para cada compuesto.

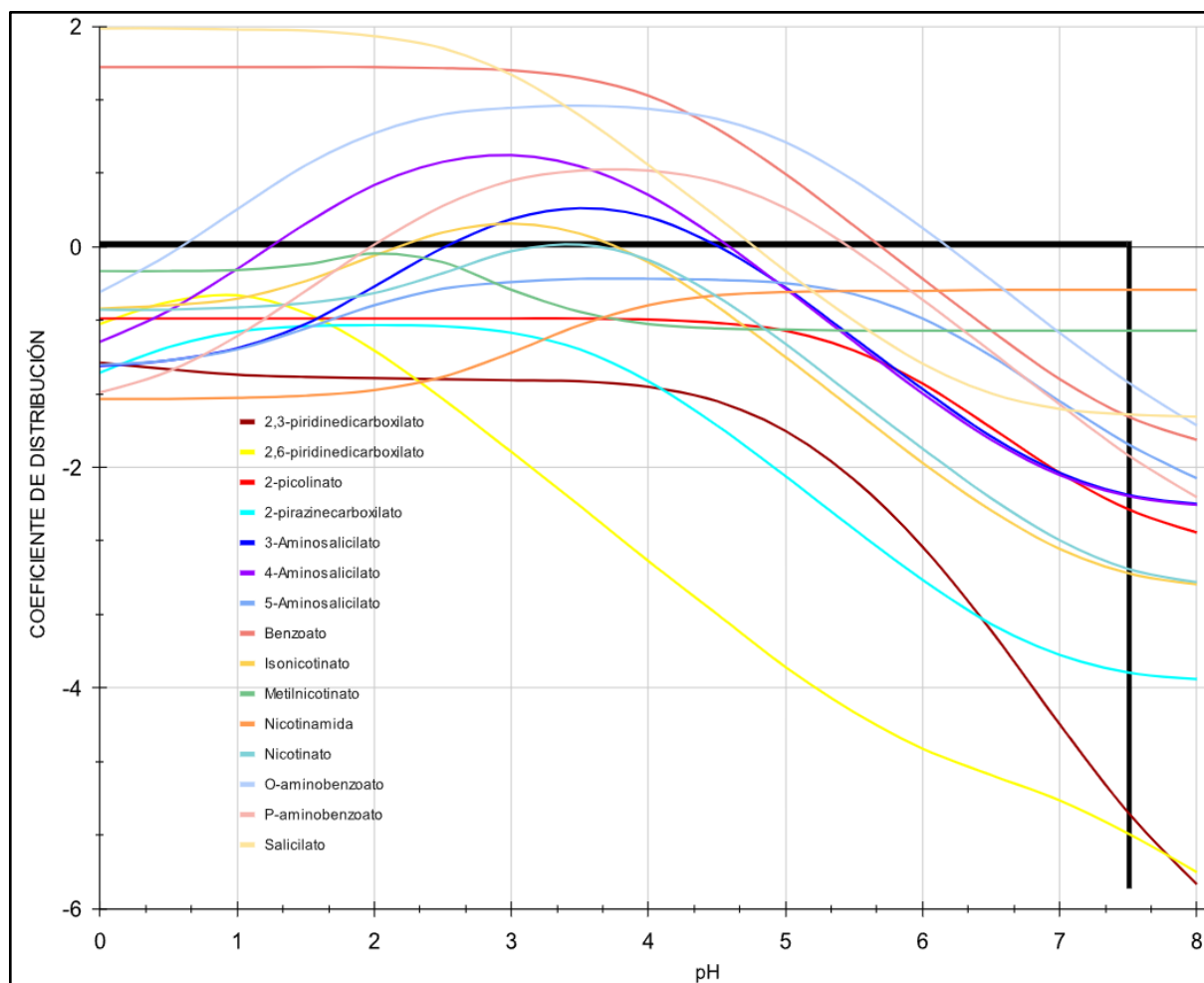


Figura 13. (B) Gráfico de las curvas del coeficiente de distribución en el rango de pH 1 a 8. El valor es > 1 si una sustancia es más soluble en disolventes similares a las grasas, como el n-octanol, y < 1 si es más soluble en agua. Los valores negativos para todos los compuestos de $\log D$ (-5,36 a -0,76) a pH relevante 7.4 llevan a concluir que los compuestos presentan una solubilidad acuosa y de menor lipofilia en el organismo. En consecuencia, esto confirma que la permeabilidad de los compuestos a la membrana celular es imposible y necesitan de un medio facilitador para atravesar, como sería SMCT1.

5.2.2 Estudios de acoplamiento molecular.

Se construyeron sistemas proteína-ligando para SMCT1 en complejo con nicotinato y los 14 compuestos relacionados. Los cálculos de docking molecular muestran conformeros consistentes entre los 15 sistemas estudiados con esta metodología. Utilizando el módulo “*Ligand Interaction Diagram*”, contenido en el paquete de Schrodinger y la evaluación manual de la distancia entre átomos específicos utilizando el software VMD, se identificaron posibles

interacciones que dan soporte al ligando dentro del sitio de unión comprendido entre los residuos F65, F85, F88, T91, Y92, W253 y Y257, de acuerdo con el procedimiento de la sección 4.2.3. Según se muestra en la tabla 2, los puntajes muestran diferencias no significativas al momento de correlacionar mediante este método mayor o menor afinidad por el sitio de unión a ligando de SMCT1. Los compuestos tipo monocarboxilatos poseen afinidad por grupos polares debido a su grupo carboxilo, así el hecho de estar rodeado en su mayoría de residuos no polares como fenilalaninas y triptófanos hacen la predicción de un enlace de hidrógeno con los residuos a 10 angstroms de T91 no visible en los confórmeros generados. Además, cabe señalar que los ensayos de acoplamiento molecular no muestran una directa relación del residuos T91 en SMCT1 con los ligandos.

Compuesto	Puntuación Glide XP	N° de poses
Nicotinamida	-5.790	107
2,6-piridinedicarboxilato	-5.418	26
3-Aminosalicilato	-5.145	70
2,3-piridinedicarboxilato	-5.044	32
2-picolinato	-5.010	90
Metilnicotinato	-4.958	76
O-aminobenzoato	-4.887	22
Salicilato	-4.875	92
Benzoato	-4.850	97
Nicotinato	-4.804	112
5-aminosalicilato	-4.754	62
4-aminosalicilato	-4.729	34
Isonicotinato	-4.695	67
P-aminobenzoato	-4.634	31
2-pirazinedicarboxilato	-4.584	117

Tabla 1: Ranking de los 15 compuestos estudiados empleando el método de puntuación Glide XP. Tabla resumen de los estudios de acoplamiento molecular. Los puntajes ordenados de más favorable a menos favorable exceptuando nicotinamida difieren aproximadamente ~ -0.9 . Se hace hincapié en la excepción de nicotinamida ya que ha sido descartado experimentalmente en el trabajo de Gopal y colaboradores (2007). El método de puntuación de Glide adiciona un puntaje positivo cuando el confórmero es energéticamente desfavorable según condiciones circundantes (sección 4.2.4).

Los compuestos de mayor afinidad frente a SMCT1 como nicotinato y 2-picolinato, sobrepasan los 100 confórmeros generados. Compuestos de mediana afinidad como metilnicotinato e isonicotinato generaron 76 y 67 confórmeros, respectivamente. Exceptuando el caso de nicotinamida que exhibe un puntaje más favorable, es uno de los compuestos con mayor número de poses generadas, alcanzando 107 confórmeros. Describimos esta estructura con un comportamiento inusual, dado que en los experimentos llevados a cabo por Gopal y colaboradores lo descartan completamente como un compuesto afín por SMCT1. Esto nos sugiere que los filtros jerárquicos que aplica Glide para discernir entre poses fisicoquímicamente favorables logra parcialmente correlacionar los estudios computacionales con la evidencia experimental en este particular caso.

En base a estos resultados, el enfoque del estudio se centró en nicotinato y metilnicotinato, dos compuestos que muestran una afinidad experimental contraria (uno de mayor y otro de menor afinidad, ver Figura 7), permitiendo evaluar los cambios estructurales de la proteína SMCT1 en interacción con compuestos de afinidades biológicamente reportadas como contrarias. En la figura 14, se observa una posible interacción de tipo pi-stacking entre el anillo pirimidínico, en caso de los compuestos análogos a nicotinato o bencílico para los compuestos tipo monocarboxilato, con el aminoácido F88. Además, los compuestos exhiben un posible enlace de hidrógeno entre el grupo carboxilo y la cadena lateral del aminoácido Y521, la cual, si bien está a más de 10 angstrom de T91, podría ser un elemento que confiera una mayor estabilidad, ya que las demás interacciones predichas por Glide son de naturaleza no enlazante, regidas por fuerzas de Van der Waals. La estructura de los compuestos estudiados contiene un anillo pirimidínico, en caso de los compuestos análogos a nicotinato o bencílico para los compuestos tipo monocarboxilato, aportando hidrofobicidad y un grupo carboxilo que añade un componente polar, lo cual va en concordancia con lo que es posible observar en el bolsillo de unión a ligandos en SMCT1. Este bolsillo presenta una zona muy hidrofóbica predominada por fenilalaninas y triptófanos, en donde, además, hay pequeñas secciones polares conferidas por tirosinas y ácidos glutámicos en menor medida.

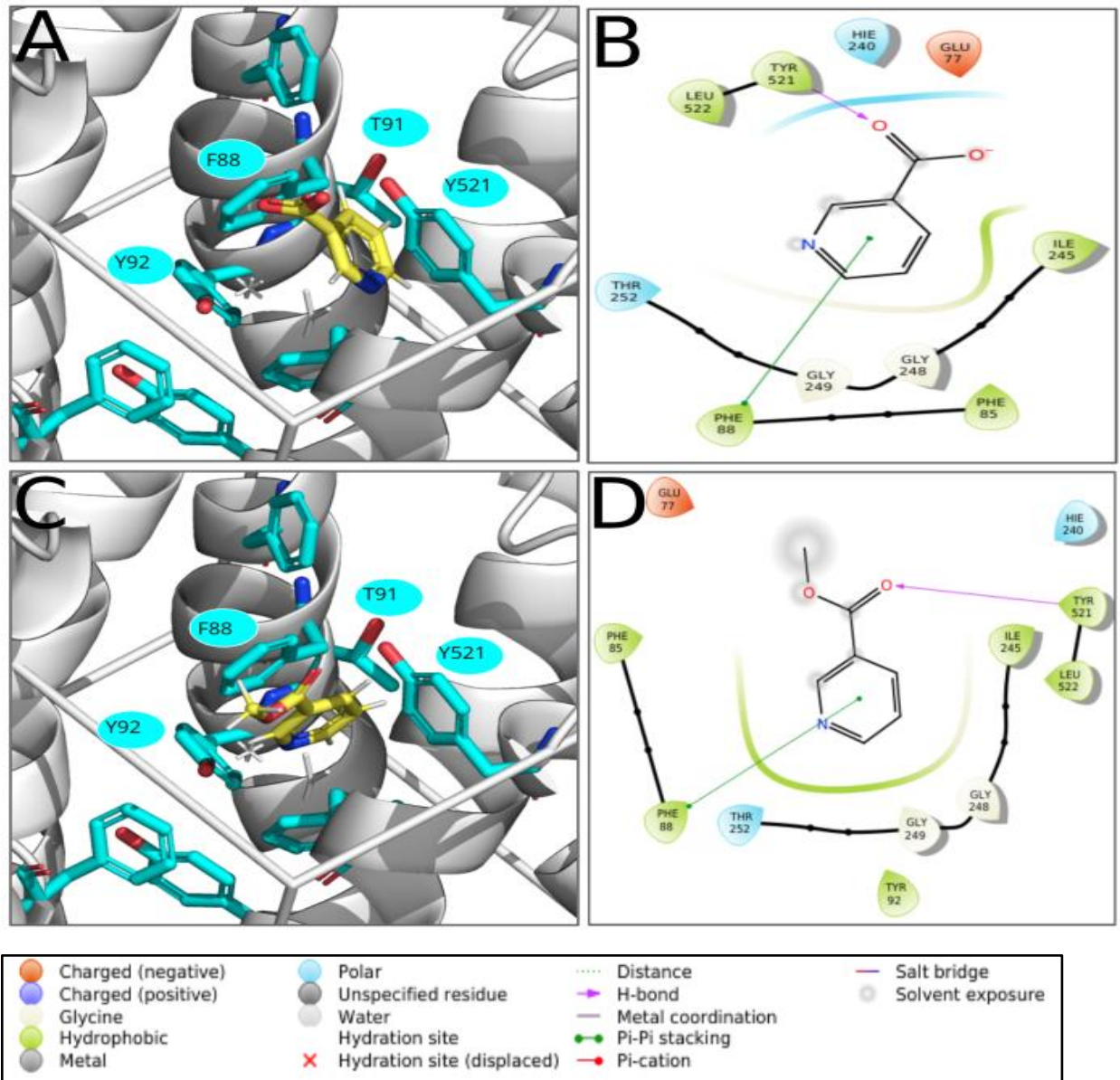


Figura 14. Confórmeros de menor energía generados para nicotinato y metilnicotinato. (A) Representación en licorice del confórmero con puntaje más favorable para nicotinato. **(B)** Diagrama de interacción para nicotinato generado a partir del módulo de Glide “ligand interaction diagram”. **(C)** Representación en licorice del confórmero con puntaje más favorable para metilnicotinato. **(D)** Diagrama de interacción para metilnicotinato a partir del módulo de Glide “ligand interaction diagram”. Se adjunta Leyenda por colores que aplica para las flechas que esquematizan posibles interacciones basadas en distancias, geometría y propiedades fisicoquímicas de los residuos y ligandos implicados.

5.3 Identificación de residuos clave en la interacción de SMCT1 con nicotinato y compuestos relacionados.

La búsqueda e identificación de residuos con un rol importante en la captación de ligandos fue llevada a cabo de modo que se contemplaran residuos presentes en todos o la mayoría de los diagramas de interacción generados a partir del módulo “Ligand Interaction Diagram” del software Glide (figura 14). Más en detalle, la búsqueda se realizó tomando en cuenta la relación inicial entre los 15 ligandos con los residuos F88 y Y521, los cuales fueron seleccionados como residuos prevalentes. Una vez realizados los estudios de acoplamiento molecular se confirmó la conservación de estos residuos por estar presentes en todos los gráficos de interacción (figura 14.1 anexos). Posteriormente, se identificaron residuos que, estando presentes en todos los gráficos de interacción, fueran fisicoquímicamente similares a los residuos iniciales de cada conformero, es decir residuos apolares como tirosinas y fenilalaninas. Así se identificaron los residuos F65, F85 y Y92. Finalmente se contempló el residuo E77 por estar presente en la mayoría de las interacciones con los compuestos, con excepción del gráfico de interacción generado para 5-aminosalicilato y 2,3-piridinedicarboxilato (figura 15).

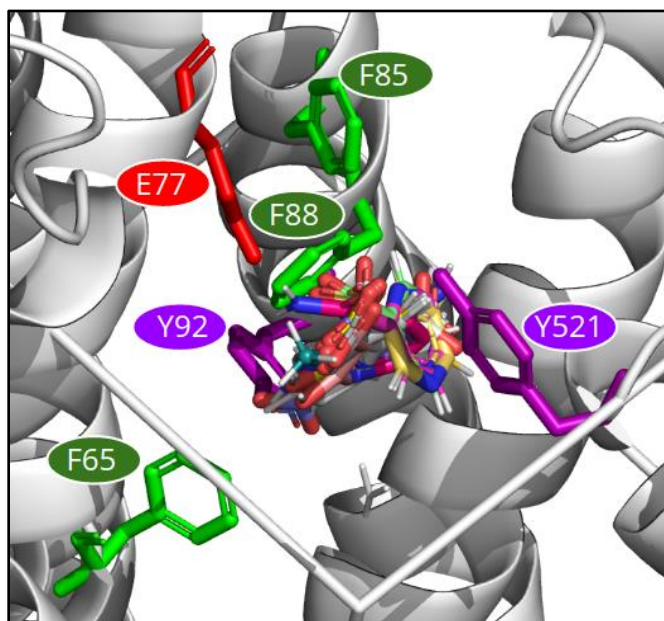


Figura 15: Resumen de la búsqueda de residuos consenso entre los 15 compuestos distintos a modo de respaldo de los estudios de acoplamiento molecular. Los residuos prevalentes identificados se muestran en esta figura, es decir, E77 - F65 - F85 - F88 - Y92 - Y521

5.4 Estudios de simulación molecular de la asociación de compuestos de diversa afinidad con SMCT1.

5.4.1 Comparación entre sistemas SMT1:Nicotinato / SMTC1:Metilnicotinato.

En base a los estudios de acoplamiento molecular y la búsqueda de residuos favorables para cumplir un rol fundamental en la captación de ligandos, los complejos de alta y mediana afinidad SMCT1_WT:nicotinato y SMCT1_WT:metilnicotinato respectivamente, fueron estudiados mediante simulación de dinámica molecular. Además, con el fin estudiar los efectos de la mutación T91G en SMCT1, se estudió también el sistema SMCT1_T91G:nicotinato para corroborar la importancia del residuo T91 y su implicancia en el transporte mediado por SMCT1. Como se muestra en las figuras 16A y 16B, el sistema SMCT1_WT:nicotinato presenta un comportamiento estable a lo largo de los primeros 150 ns de simulación producto de las restricciones aplicadas con colvars. Durante la última fase de restricciones, se tiene un comportamiento mucho más inestable, pero que de todas formas se evidencia una notoria disminución de las distancias entre nicotinato y los residuos en los últimos 8 ns de simulación (ver figura 16 B).

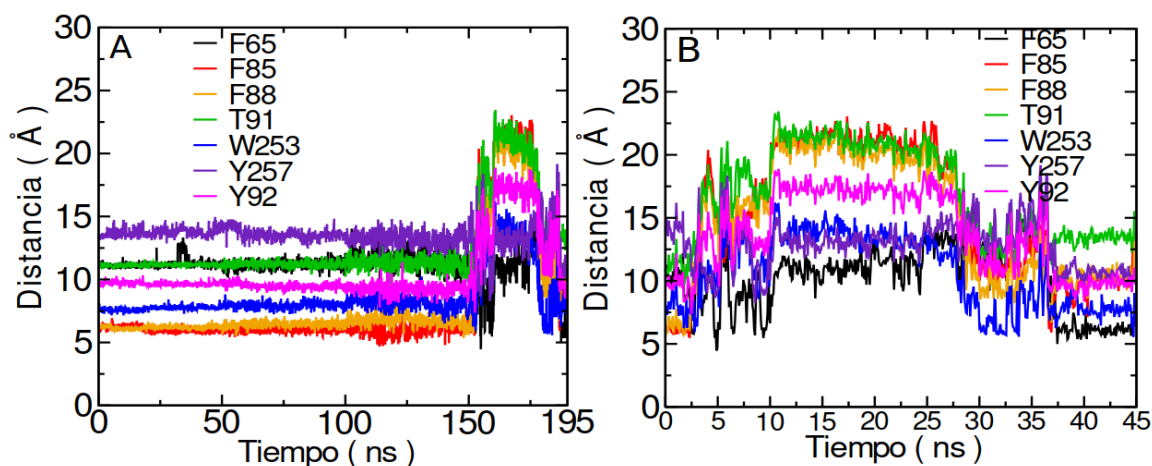


Figura 16: Simulación de dinámica molecular para nicotinato en sistema wild type. (A) Gráfico de distancia desde el centro de masa de nicotinato con el carbono alfa de los residuos del sitio de unión a ligando. Análisis efectuados a lo largo de 150 ns de simulación donde se implementaron fuerzas restrictivas por medio del módulo colvars. **(B)** Acercamiento de los últimos 45 ns de simulación molecular correspondientes al gráfico de la figura 16A.

Durante la última fase de la trayectoria de simulación de SMCT1 con Nicotinato (figura 14), éste abandona durante algunos nanosegundos la posición determinada mediante estudios de acoplamiento molecular, donde se cree que podría estar visitando algunos bolsillos o regiones favorables cercanas. Posiblemente al extender los tiempos de simulación hubiésemos logrado evidenciar una completa estabilización del Nicotinato en su bolsillo de unión en la proteína SMCT1. Por otro lado, en esta misma porción del cálculo, se estudiaron las frecuencias absolutas correspondientes a las distancias a los residuos más visitados o cercanos al Nicotinato (figura 18A).

El sistema SMCT1 WT:metilnicotinato evidencia un comportamiento mucho más irregular en cuanto a la distancia entre Metilnicotinato y nuestro bolsillo de unión definido (figura 17A y 17B). En los últimos 8 ns de simulación, a diferencia de Nicotinato, Metilnicotinato muestra amplias distancias frente a la proteína, por lo que el extender las simulaciones no hubiese mostrado un acercamiento de esta molécula al bolsillo de unión en SMCT1. Como se muestra en la figura 18B aunque las distancias no aumentan significativamente como en el sistema SMCT1_WT:nicotinato, el sistema SMCT1_T91G:metilnicotinato, no visita tan solo a algunos pocos residuos, si no que más bien el compuesto metilnicotinato es mucho más promiscuo en cuanto a los residuos que visita (figura 18B), por lo que pasados los primeros 40 ns de última ventana de simulación aún no es capaz de establecer alguna interacción significativa, lo que finalmente termina implicando que abandone el sitio de unión.

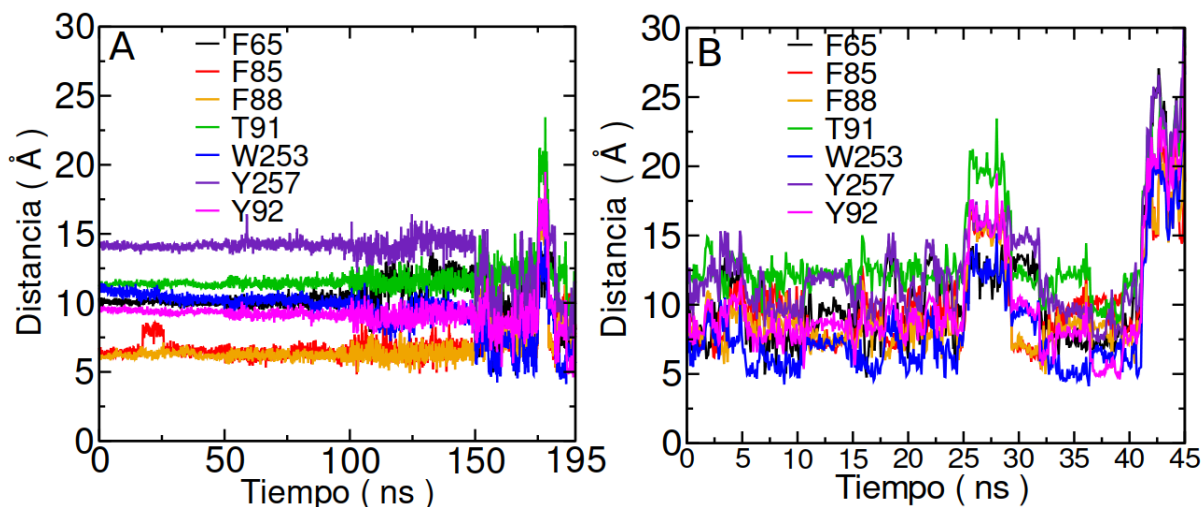


Figura 17: Simulación de dinámica molecular para metilnicotinato en el sistema SMCT1 wild type. (A) Gráfico de distancia desde el centro de masa de metilnicotinato con el carbono alfa de los residuos del sitio de unión a ligando. **(B)** Acotación de los últimos 45 ns de simulación del gráfico de la figura 17A.

Durante las simulaciones de dinámica molecular nicotinato en el sistema SMCT1 WT visita 7 residuos en distintos intervalos a lo largo de los últimos 45 ns de simulación (figura 18A); por el contrario, metilnicotinato visita 18 residuos en distintas instancias de la simulación (figura 18B). Dado que metilnicotinato es un análogo estructural de nicotinato con un grupo metil extra, se atribuye a su estructura de mayores dimensiones y por consiguiente un mayor volumen, la capacidad de visitar las cercanías de un mayor número de residuos. Como se comentó en la introducción de este estudio, la mutación T91G experimentalmente muestra una reducción de los niveles de transporte para nicotinato, lo cual podría no ser el caso de estructuras análogas, como metilnicotinato. Debido a su alta similitud estructural, pero difiriendo de la estructura consenso en apenas un grupo metilo, el aumento en hidrofobicidad de metilnicotinato como se muestra en la figura 14 podría llevar a distintos modos de unión dentro de SMCT1, fenómeno que ha sido estudiado recientemente (Kasahara & Kinoshita, 2016).

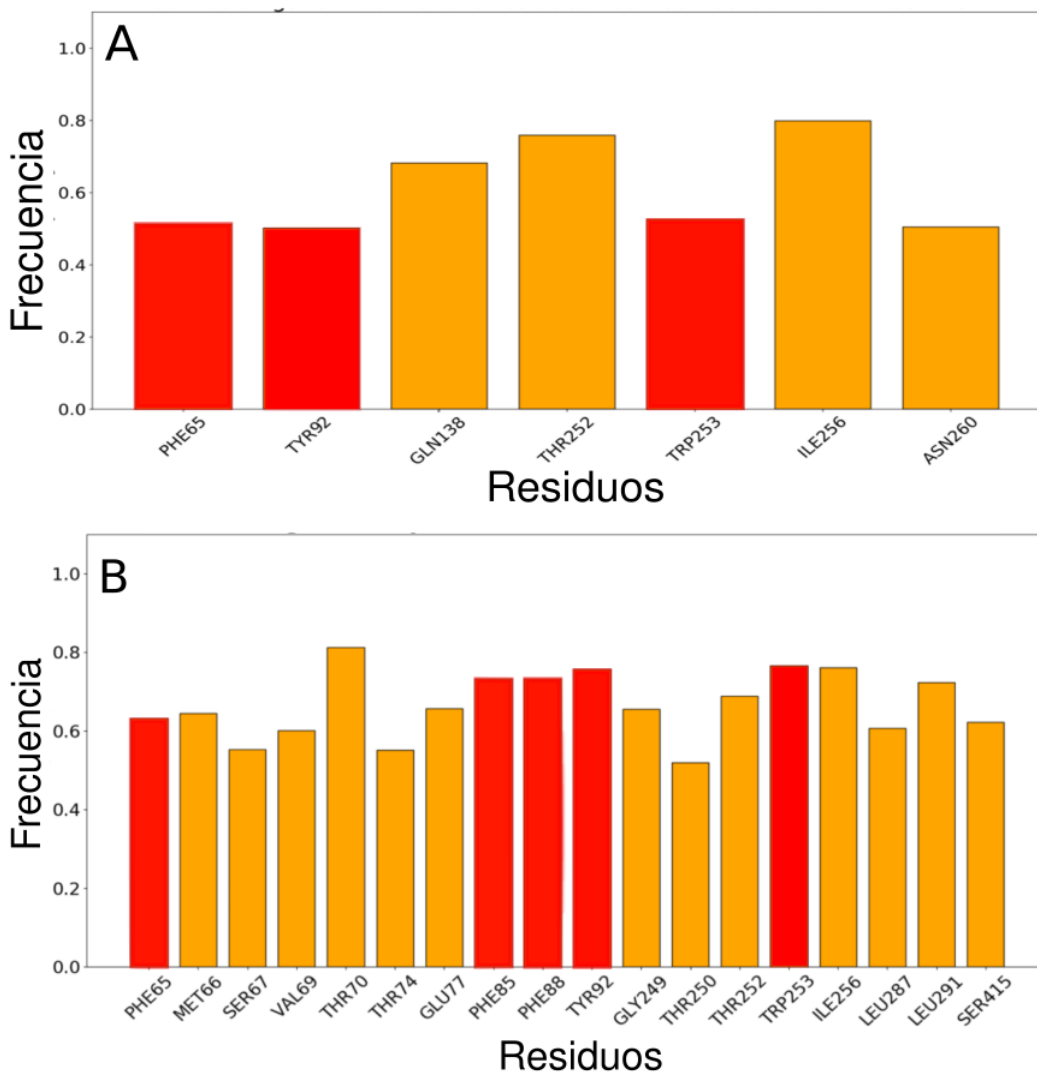


Figura 18: Gráfico de frecuencia en los 45 ns finales de simulación de dinámica molecular para nicotinato y metilnicotinato interactuando con el sistema SMCT1 wild type. (A) Gráfico de frecuencia de visitas en el tiempo a residuos en SMCT1 por parte de nicotinato con un cutoff de 7Å durante los últimos 45 ns de simulación. Se destacan los residuos prevalentes seleccionados en la **sección 5.3**, es decir, F65 y Y92, además de W253 por ser del set de residuos a 10Å de T91. **(B)** Gráfico de frecuencia de visita en el tiempo a residuos en SMCT1 por parte de metilnicotinato con un cutoff de 7Å durante los últimos 45 ns de simulación, donde se destacan los residuos prevalentes destacados en la **sección 5.3**, es decir, F65, F85, F88 y Y92, además de W253 por ser del set de residuos a 10Å de T91.

Durante los últimos 45 ns de simulación, tanto nicotinato como metilnicotinato intentan asociarse a residuos favorables a interacción descritos en la sección 5.3. Nicotinato y metilnicotinato intentan establecer enlaces de hidrógeno con el residuo Y92 (figura 19C y 19D), durante los primeros 3 ns y los últimos 9 ns. Metilnicotinato frecuenta un set más amplio de residuos, como se muestra en la figura 18B, siendo parte de los residuos F65, F85, F88, Y92 y W253. Este último si bien no está en la lista de residuos favorables, si forma parte de los 6 residuos iniciales con los cuales se forma el bolsillo de unión a ligando en SMCT1. Con los estudios de acoplamiento molecular se tuvo un primer acercamiento a la tendencia de estos compuestos por asociarse a residuos con capacidad por generar interacciones pi-stacking, esto sumado a la aparición de F65 y W253 dentro los residuos prevalentes, confirma que estas interacciones podrían estar implicadas en la estabilización de ligando. Esta sospecha necesita de estudios más específicos y capaces de tomar en cuenta la actividad de nubes electrónicas, características de este tipo de interacciones (figura 19 y 20).

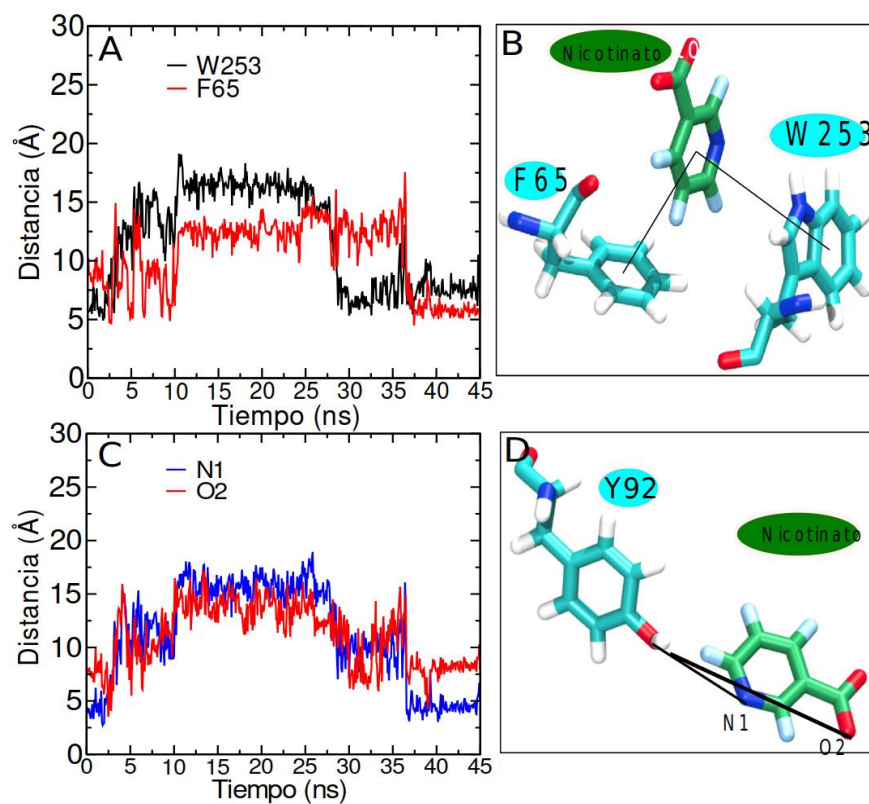


Figura 19: Simulación de dinámica molecular para nicotinato en el sistema SMCT1 wild type. (A) Gráfico de distancia desde el centro de masa del anillo pirimidina de nicotinato con el centro

de masa del anillo indol de la cadena lateral de W253 y el anillo fenilo de F65. **(B)** Representación figura 19A. **(C)** Gráfico de distancia desde el átomo de nitrógeno del anillo pirimidina y el átomo de oxígeno del grupo carboxilo de nicotinato con el átomo de oxígeno de la cadena lateral de Y92. **(E)** Figura resumen de los primeros 3 ns y los últimos 9 ns de simulación del sistema SMCT1 con nicotinato.

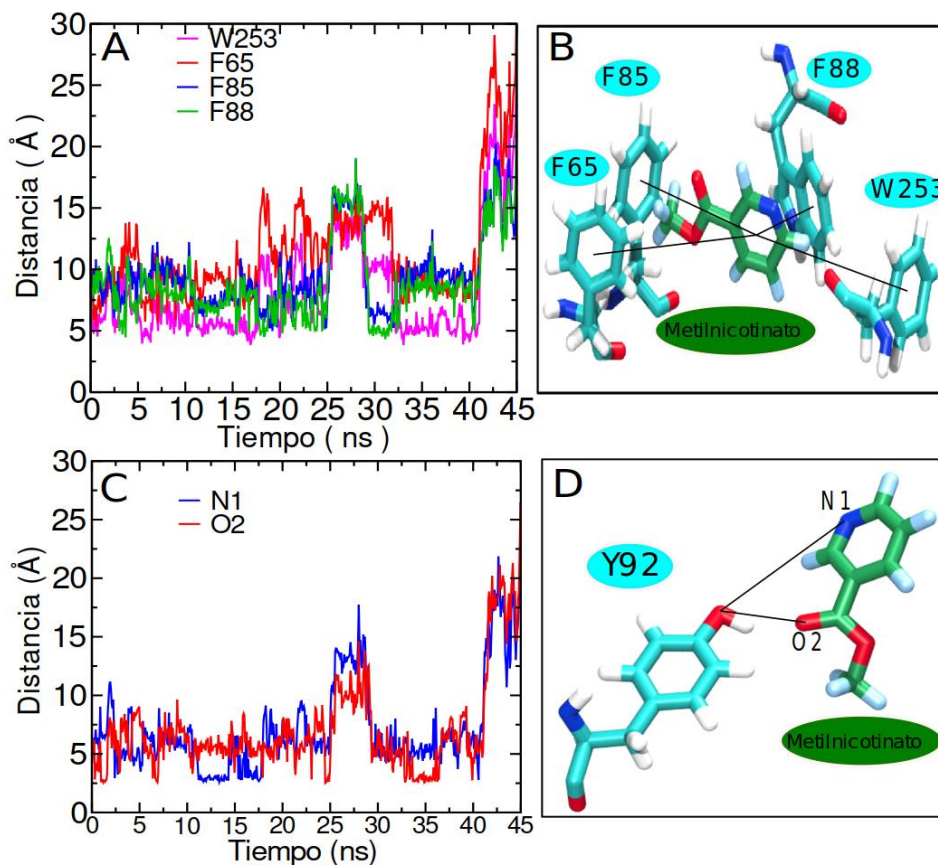


Figura 20: Simulación de dinámica molecular para metilnicotinato en el sistema SMCT1 wild type. (A) Gráfico de distancia desde el centro de masa del anillo pirimidina de metilnicotinato con el centro de masa de los anillos fenilo de F65 e indol de la cadena lateral de W253. **(B)** Representación figura 20A. **(C)** Gráfico de distancia desde el átomo de nitrógeno del anillo pirimidina y el átomo de oxígeno del grupo carboxilo de metilnicotinato con el átomo de oxígeno de la cadena lateral de Y92. **(E)** Figura resumen de los primeros 3 ns y los últimos 9 ns de simulación del sistema SMCT1 con metilnicotinato.

5.4.2 Comparación entre sistemas SMCT1 WT:Nicotinato / SMCT1 T91G:Nicotinato.

En el sistema SMCT1 T91G:nicotinato, posterior a los 150 ns de simulación con fuerzas restrictivas, nicotinato abandona el sitio de unión a ligando, saliendo completamente del transportador (figura 21A y 21B). Consecuentemente, debido al tiempo que nicotinato permanece dentro del sitio de unión a ligando no le es posible frecuentar residuos y abandona la proteína quedando en el entorno circundante a la membrana y la proteína en los últimos 43 ns de simulación (figura 21B). Además, comparando las figuras 18A y 21C, nicotinato en el sistema mutado no es capaz de establecer algún tipo de interacción significativa con el residuo Y92 en comparación con el sistema SMCT1 WT:nicotinato.

Considerando una comparación entre los sistemas SMCT1_WT:Metilnicotinato y SMCT_WT: Nicotinato, se podría indicar que en ambos se mantiene que, a una mayor cantidad de residuos visitados por dicho compuesto en estudio, los modos de unión en el bolsillo podrían diferir con respecto al volumen de los grupos que diferencian a los compuestos análogos. En consecuencia, el efecto de la mutación T91G, incrementa el número de residuos que aparecen en los análisis de frecuencias de residuos visitados en el tiempo, producto de que nicotinato en el sistema mutado en el corto periodo de 2 ns antes de abandonar el bolsillo de unión, se desplaza a lo largo del sitio para finalmente abandonarlo.

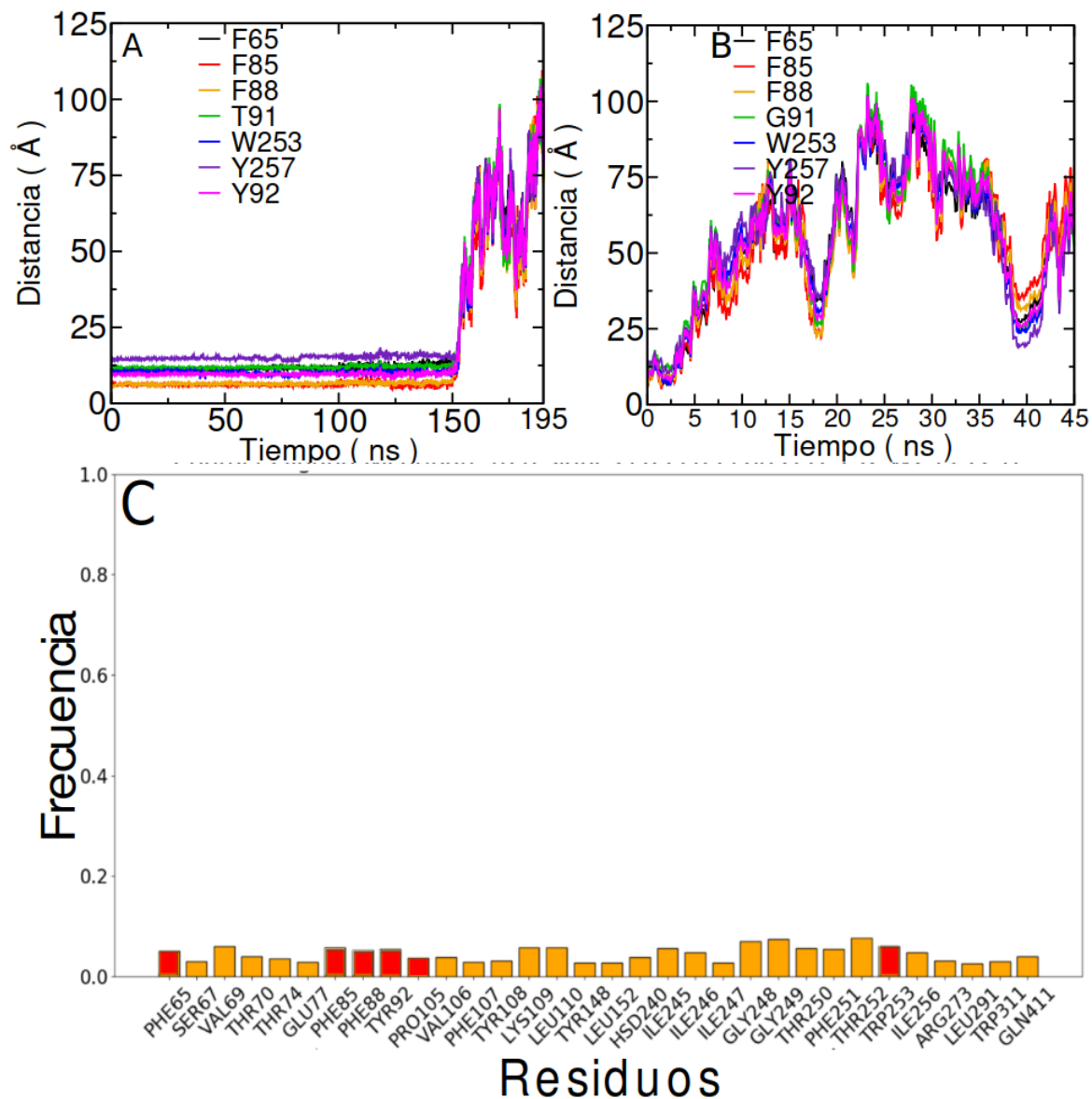


Figura 21: Simulación de dinámica molecular para nicotinato en el sistema SMCT1 con la mutación T91G. (A) Gráfico de distancia desde el centro de masa de nicotinato con el carbono alfa de los residuos del sitio de unión a ligando a lo largo de la simulación molecular. **(B)** Acotación de los últimos 45 ns de simulación del gráfico de la figura 15A. **(C)** Gráfico de frecuencia de visita en el tiempo a residuos en SMCT1 por parte de nicotinato con un cutoff de 7Å durante los últimos 45 ns de simulación, donde nicotinato no es capaz de visitar con una frecuencia mayor al 10% del tiempo a ninguno de los residuos mencionados en la sección 5.3.

5.5 Evaluación de la unión de nicotinato con SMCT1 wild type y bajo la mutación T91G.

Como enfoque principal de este estudio, el residuo T91 no exhibe un rol principal en la captación de ligandos debido a que los gráficos de distancia en el tiempo muestran que es uno de los residuos más lejanos a nicotinato y metilnicotinato (figuras 16A,16B,17A y 17B; barras de color verde). Por otro lado, T91 parece ejercer un rol estructural en el bolsillo de unión a ligandos, ya que al estar relacionado al residuo F88 durante las simulaciones (figura 22A), este provoca mayor variación en la cadena lateral de F88 (figura 22B). Este hecho, permite hipotetizar que F88 actúa como eje central para la unión de los conformeros, ya que en ausencia de T91, nicotinato no fue capaz de establecer interacciones significativas con los residuos circundantes a F88, abandonando el sitio de unión a ligando en SMCT1.

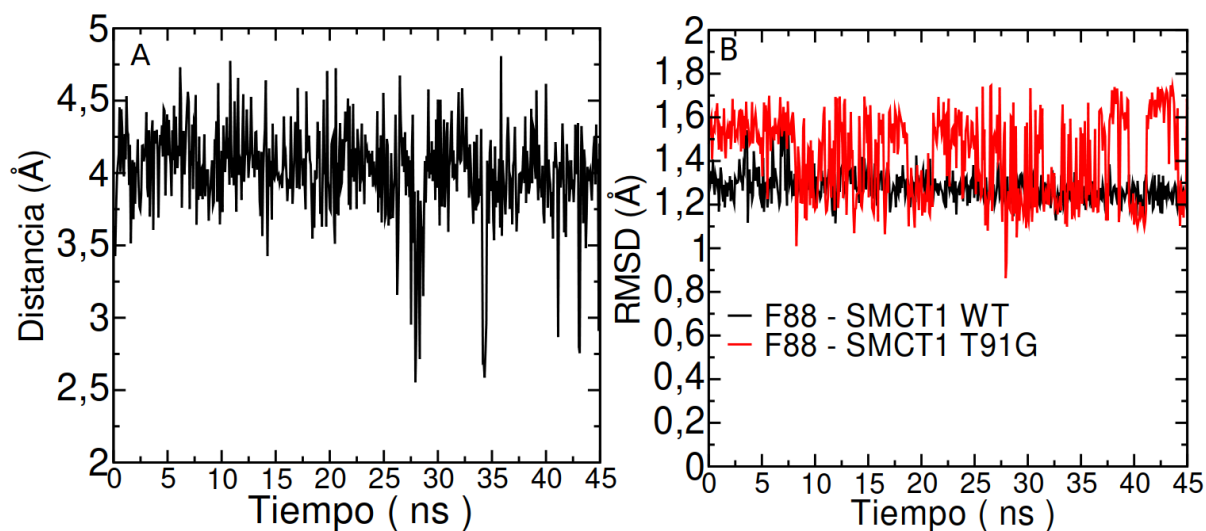


Figura 22: Comparación de distancias y rmsd en sistemas SMCT1 wild type y con la mutación T91G. (A) Gráfico de la distancia en los últimos 45 ns de simulación desde el átomo de oxígeno perteneciente al backbone del residuo F88 hasta el oxígeno del grupo OH de la cadena lateral carboxílica del residuo T91 en SMCT1 wild type (3.68 angstroms promedio). **(B)** Gráfico para la comparación de la desviación cuadrática media (RMSD) en los últimos 45 ns de simulación entre el sistema SMCT1 wild type (barras color negro) y con la mutación T91G (barras color rojo).

Al observar la superposición de estructuras en los últimos 45 ns de simulación de los sistemas SMCT1 WT y mutado (figura 23A), es posible identificar una distorsión en la posición de

los segmentos transmembranales 8 y 7, en donde están los residuos prevalentes F65, F85 y W253. Más en detalle, es posible confirmar la distorsión que provoca la mutación T91G en el bolsillo de unión a ligando, ya que la cadena lateral del residuo W253 incide hacia el centro, lo cual está en concordancia con los estudios de la Dra. Ariela Vergara y colaboradores 2017 (figura 23B). Sumado a esto, la cadena lateral del residuo Y92 cambia de orientación. Los residuos Y92 y W253 se acercan a los ligandos nicotinato y metilnicotinato en los sistemas wildtype; sin embargo, cuando existe la mutación T91G, esta relación se dificulta debido a los cambios de orientación en las cadenas laterales.

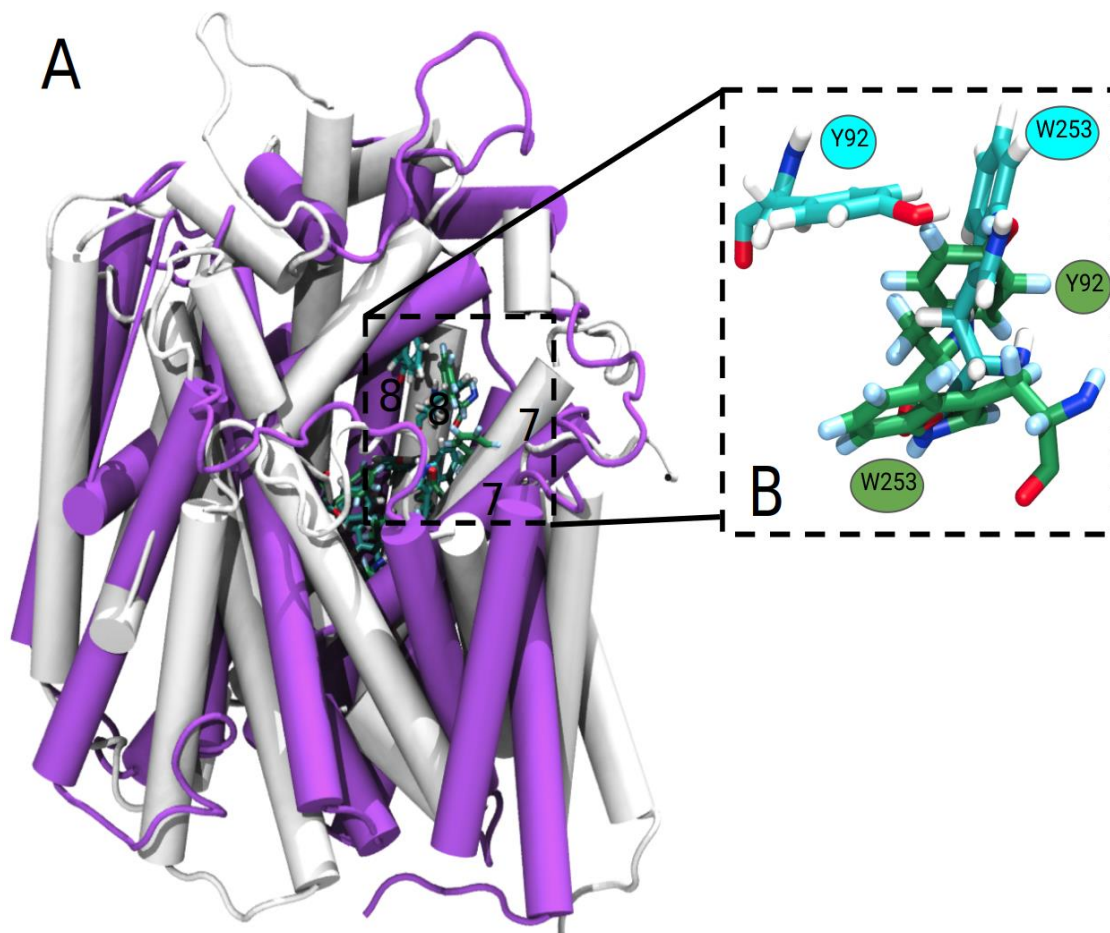


Figura 23: Comparación estructural sistemas SMCT1 wild type y con la mutación T91G. (A) Comparación en la distorsión de los segmentos transmembranales entre el sistema SMCT1 wild type (representado en cartoon color morado) y con la mutación T91G (representado en cartoon color blanco). **(B)** Comparación en la distorsión de la orientación de las cadenas laterales en los residuos Y92 y W253 (en verde wild type, en celeste mutación T91G).

6. CONCLUSIONES

El transportador SMCT1 es una proteína de membrana, la cual hasta la fecha carece completamente de estudios que logren determinar por completo su mecanismo de transporte y recaptación de sustratos. Si bien experimentalmente sus características, propiedades y roles se han descrito ampliamente, computacionalmente carece de estudios concluyentes, en donde el hecho de no existir estructuras cristalinas oficiales en bases de datos confiables como PDB, dificulta el curso de acciones para esclarecer su funcionamiento. En este ámbito, metodologías como el modelado por homología permitieron obtener modelos estructuralmente confiables de SMCT1 en base a un templado en una conformación orientada al medio externo. Cabe señalar que este modelo condiciona estudiar solo una fracción de los cambios conformacionales que puede experimentar la proteína en la membrana. Por otro lado, la necesidad de estudios similares y concluyentes que permitan determinar el mecanismo y el efecto de la translocación del ion de sodio acoplado al movimiento de los distintos compuestos con afinidad por SMCT1 ayudarían a guiar con mayor exactitud futuros estudios estructurales sobre este transportador.

En cuanto a los estudios de acoplamiento molecular, pese a que no permitieron una correlación directa entre el sistema de puntuación de GlideXP y la afinidad por SMCT1 de los distintos compuestos, permiten tener un primer acercamiento a los residuos que interactúan con nicotinato y metilnicotinato, es decir, F65, F85, F88, Y92 y W253. Este bolsillo de unión presenta una dualidad hidrofóbica y polar, la cual podría no haber sido reproducida del todo, debido al impacto de las regiones no modeladas del transportador. Por otro lado, los estudios de docking se caracterizan por tener implementaciones de scores de carácter aditivos, por lo que en cuanto a la puntuación asignada por software Glide, influyó drásticamente el tamaño de cada compuesto, impidiendo que se representarán fielmente lo resultados obtenidos por Gopal y colaboradores.

Las simulaciones de dinámica molecular permitieron evidenciar la diferencia en la capacidad de SMCT1 para interactuar nicotinato en estado wild type y mutado, ya que, si bien las simulaciones con nicotinato mostraron cierta interacción en el sistema wildtype, el sistema con la mutación T91G fue incapaz de lograr en algún momento dicha unión, donde nicotinato

abandonó rápidamente el sitio en los primeros ns de simulación. En este ámbito, el rol del residuo treonina 91 fue vinculado a una función estructural, debido a que al estar relacionado estrechamente a residuos identificados como claves en la unión a sustratos como fenilalanina 88, su ausencia repercute en la coordinación de residuos cercanos como Y92 y W253. Sumado a esto, la naturaleza de residuos de carácter aromático en el bolsillo de unión a ligando nos permite hipotetizar que la captación de ligandos por parte de SMCT1 se produzca por interacciones con características electrostáticas de tipo pi-pi o pi-stacking, las cuales no es posible simular con el campo de fuerza CHARMM36. Sin embargo, creemos que, con la incorporación de métodos de dinámica molecular aún más rigurosos, como es el caso de metodologías híbridas QM/MM o el uso del campo de fuerza polarizable Drude (Li *et al.*, 2017), nos permitirían una caracterización más detallada sobre las interacciones pi-Stacking que podrían establecerse estos sistemas.

Los compuestos tipo monocarboxilato presentes en este estudio es un tipo particular de moléculas de bajo tamaño y alta promiscuidad de unión, las cuales necesitan de métodos sofisticados para su caracterización. Como se plantea en este estudio, la unión de estos compuestos a SMCT1 podrían ocurrir a través de interacciones no descritas en el campo de fuerza CHARMM36. Aun así, fue posible determinar el rol estructural del residuo T91, el cual en términos generales sugiere que debido a la mutación por G91 el bolsillo de unión a ligandos sufre distorsiones importantes en las cadenas laterales de los residuos que destacan por su relación con los compuestos estudiados en este trabajo.

7. REFERENCIAS

- Beamer WH & Atchison GJ (2002) ACS Publications. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60038a020>. Accessed 2 October 2021.
- Buchan DWA & Jones DT (2019) The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research* 47:W402–W407.
- Busch W & Saier MH (2002) The Transporter Classification (TC) System, 2002. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37:287–337.
- Cui D & Morris ME (2009) The Drug of Abuse γ -Hydroxybutyrate Is a Substrate for Sodium-Coupled Monocarboxylate Transporter (SMCT) 1 (SLC5A8): Characterization of SMCT-Mediated Uptake and Inhibition. *Drug Metab Dispos* 37:1404–1410.
- Dahl SG, Sylte I & Ravna AW (2004) Structures and models of transporter proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 309:853–860.
- Fricker RA, Green EL, Jenkins SI & Griffin SM (2018) The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System. *Int J Tryptophan Res* 11:1178646918776658.
- Gonçalves P & Martel F (2016) Regulation of colonic epithelial butyrate transport: Focus on colorectal cancer: *Porto Biomedical Journal* 1:83–91.
- Gopal E, Miyauchi S, Martin PM, Ananth S, Roon P, Smith SB & Ganapathy V (2007) Transport of Nicotinate and Structurally Related Compounds by Human SMCT1 (SLC5A8) and Its Relevance to Drug Transport in the Mammalian Intestinal Tract. *Pharm Res* 24:575–584.
- Goswitz VC & Brooker RJ (2008) Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. *Protein Science* 4:534–537.
- Gyimesi G, Pujol-Giménez J, Kanai Y & Hediger MA (2020) Sodium-coupled glucose transport, the SLC5 family, and therapeutically relevant inhibitors: from molecular discovery to clinical application. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 472:1177–1206.
- Harvey Lodish (2016) *Molecular Cell Biology*, 8th ed. W. H. Freeman and Company.

- He Y, He L, Khoshaba R, Lu F, Cai C, Zhou F, Liao D & Cao D (2019) Curcumin Nicotinate Selectively Induces Cancer Cell Apoptosis and Cycle Arrest through a P53-Mediated Mechanism. *Molecules* 24:4179.
- Kang M-K & Tullman-Ercek D (2018) Engineering expression and function of membrane proteins. *Methods (San Diego, Calif)* 147:66–72.
- Karpowich NK & Wang D-N (2008) STRUCTURAL BIOLOGY: Symmetric Transporters for Asymmetric Transport. *Science* 321:781–782.
- Kasahara K & Kinoshita K (2016) Landscape of protein–small ligand binding modes. *Protein Sci* 25:1659–1671.
- Landry ML & Crawford JJ (2020) LogD Contributions of Substituents Commonly Used in Medicinal Chemistry. *ACS Med Chem Lett* 11:72–76.
- Li H, Chowdhary J, Huang L, He X, MacKerell AD & Roux B (2017) Drude Polarizable Force Field for Molecular Dynamics Simulations of Saturated and Unsaturated Zwitterionic Lipids. *J Chem Theory Comput* 13:4535–4552.
- Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, Lutterbaugh J, Rerko RM, Casey G, Issa J-P, Willis J, Willson JKV, Plass C & Markowitz SD (2003) *SLC5A8*, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *PNAS* 100:8412–8417.
- van Meer G, Voelker DR & Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124.
- Miyauchi S, Gopal E, Fei Y-J & Ganapathy V (2004) Functional Identification of *SLC5A8*, a Tumor Suppressor Down-regulated in Colon Cancer, as a Na⁺-coupled Transporter for Short-chain Fatty Acids. *J Biol Chem* 279:13293–13296.
- Mueckler M & Thorens B (2013) The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 34:121–138.
- Niimi AJ (1979) Quantitative Analysis of Carbon-14 Labelled Polychlorinated Biphenyls and Hexachlorobenzene in Biological Samples Using an Oxidative Combustion Method. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 6:267–271.

- Nikas IP, Paschou SA & Ryu HS (2020) The Role of Nicotinamide in Cancer Chemoprevention and Therapy. *Biomolecules* 10:477.
- Ohkubo M, Ohta K, Inoue K & Yuasa H (2012) Nicotinate Uptake by Two Kinetically Distinct Na⁺-Dependent Carrier-Mediated Transport Systems in the Rat Small Intestine. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 27:255–262.
- Paroder-Belenitsky M, Maestas MJ, Dohan O, Nicola JP, Reyna-Neyra A, Follenzi A, Dadachova E, Eskandari S, Amzel LM & Carrasco N (2011) Mechanism of anion selectivity and stoichiometry of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:17933–17938.
- Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R & Finn RD (2018) HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 46:W200–W204.
- Remmert M, Biegert A, Hauser A & Söding J (2011) HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods* 9:173–175.
- Rodriguez A-M, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart J-M & Pourcher T (2002) Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3500–3503.
- Ruddock MW, Burns DM, McKeown SR, Murphy L, Walsh IK, Keane PF & Hirst DG (2000) Contractile properties of human renal cell carcinoma recruited arteries and their response to nicotinamide. *Radiother Oncol* 54:179–184.
- Ruddock MW & Hirst DG (2004) Nicotinamide relaxes vascular smooth muscle by inhibiting myosin light chain kinase-dependent signaling pathways: implications for anticancer efficacy. *Oncol Res* 14:483–489.
- Said HM (2004) Recent Advances in Carrier-Mediated Intestinal Absorption of Water-Soluble Vitamins. *Annu Rev Physiol* 66:419–446.
- Schwarcz R & Stone TW (2017) The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology* 112:237–247.
- Stanley S, Moheet A & Seaquist ER (2019) Central Mechanisms of Glucose Sensing and Counterregulation in Defense of Hypoglycemia. *Endocrine Reviews* 40:768–788.

- Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Käll L & Elofsson A (2015) The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res* 43:W401–W407.
- Vergara-Jaque A, Fong P & Comer J (2017) Iodide Binding in Sodium-Coupled Cotransporters. *J Chem Inf Model* 57:3043–3055.
- Whitman SP, Hackanson B, Liyanarachchi S, Liu S, Rush LJ, Maharry K, Margeson D, Davuluri R, Wen J, Witte T, Yu L, Liu C, Bloomfield CD, Marcucci G, Plass C & Caligiuri MA (2008) DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication. *Blood* 112:2013–2016.
- Wright EM (2013) Glucose transport families SLC5 and SLC50. *Molecular Aspects of Medicine* 34:183–196.

8. ANEXOS

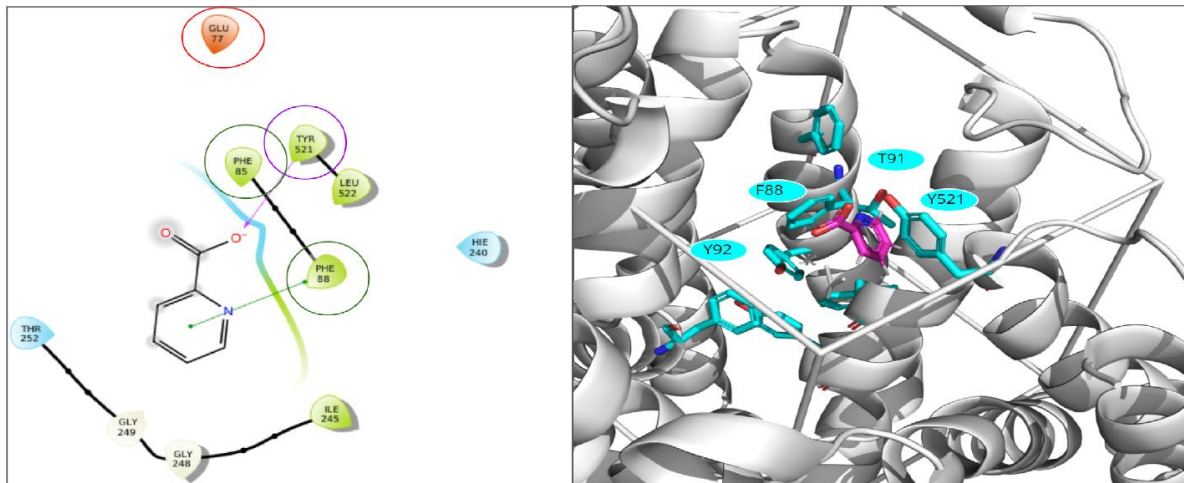


Figura 14.1.1. Grafico de interaccion sistema SMCT1:2-picolinato

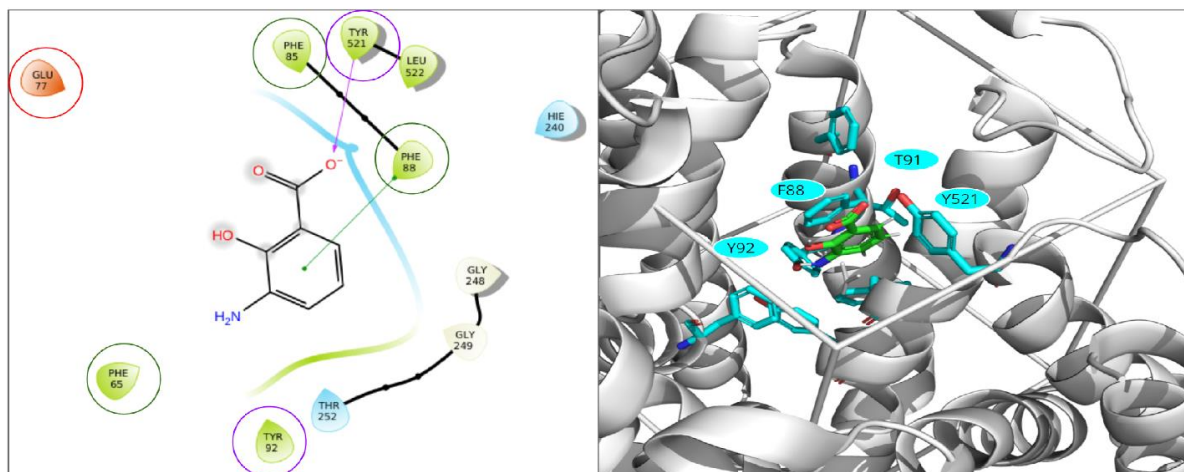


Figura 14.1.2. Grafico de interaccion sistema SMCT1:3-Aminosalicilato

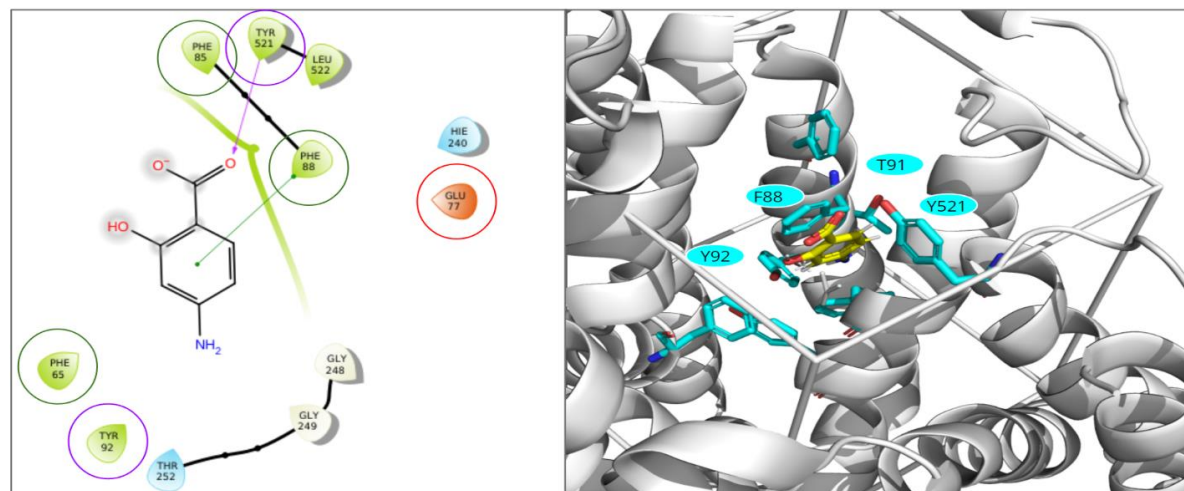


Figura 14.1.3. Grafico de interaccion sistema SMCT1:4-Aminosalicilato

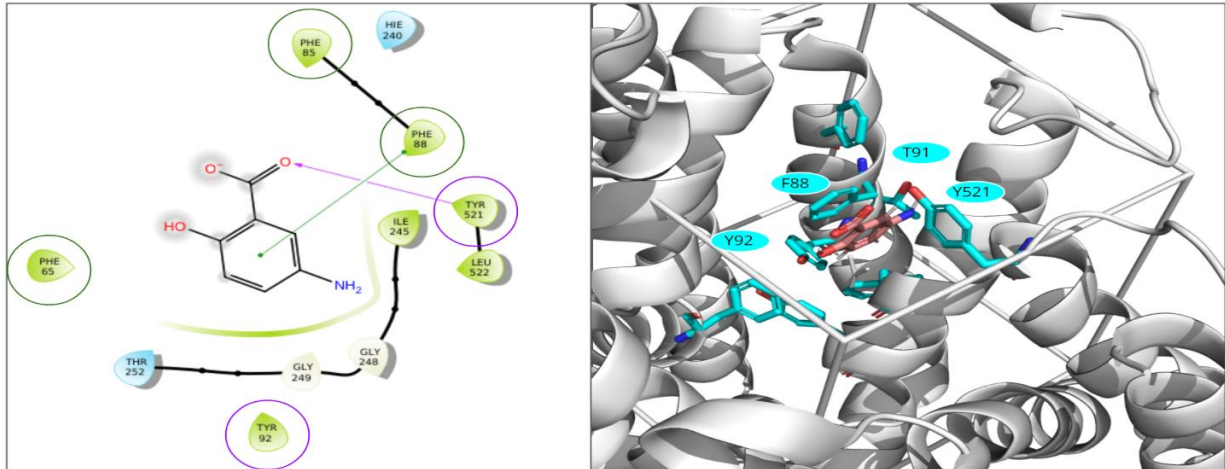


Figura 14.1.4. Grafico de interaccion sistema SMCT1:5-aminosalicilato

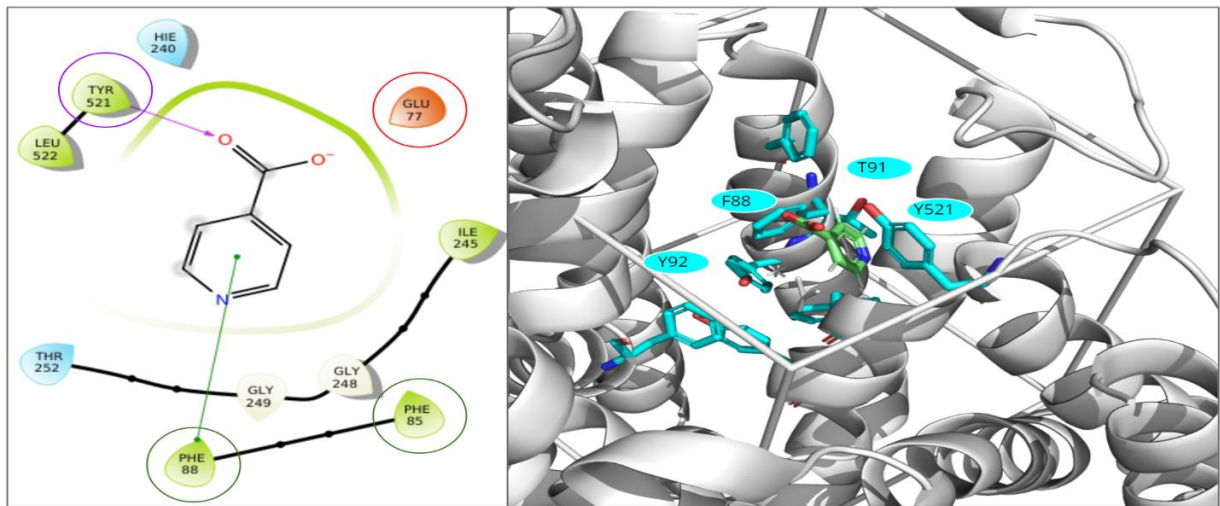


Figura 14.1.5. Grafico de interaccion sistema SMCT1:Isonicotinato

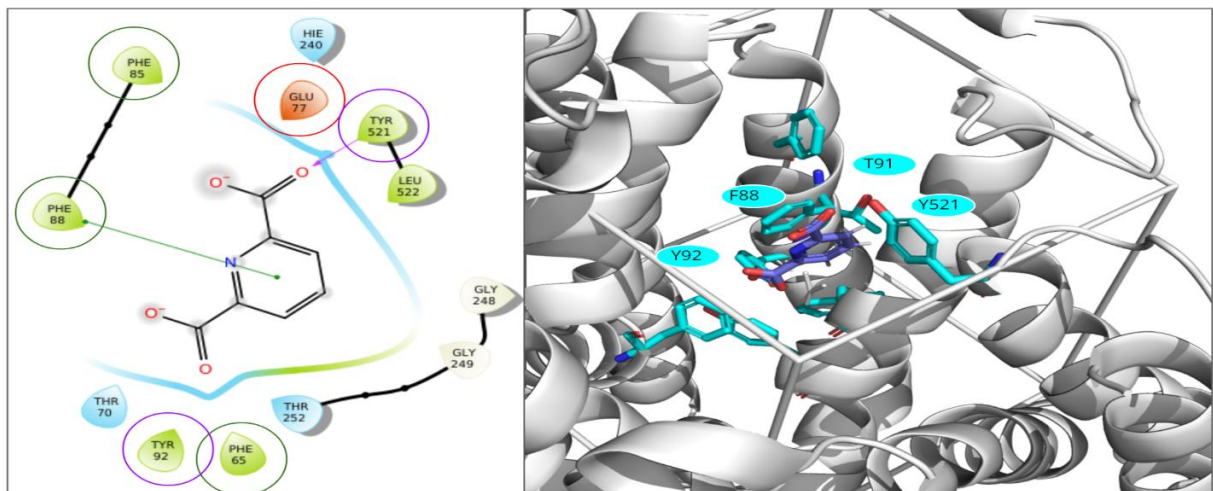


Figura 14.1.6. Grafico de interaccion sistema SMCT1:2,6-piridinedicarboxilato

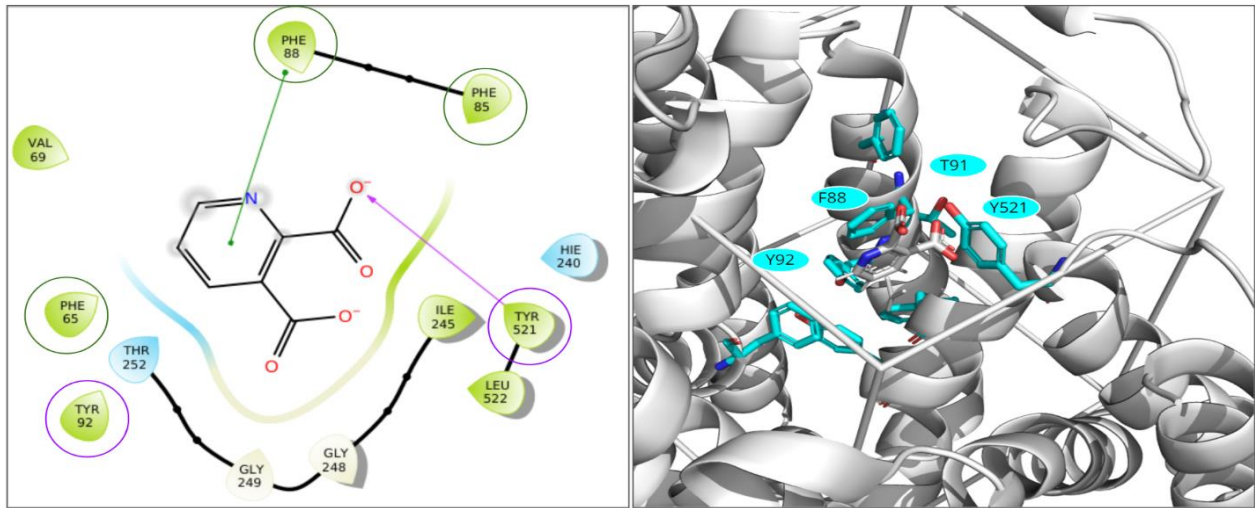


Figura 14.1.7. Grafico de interaccion sistema SMCT1:2,3-Piridinedicarboxilato

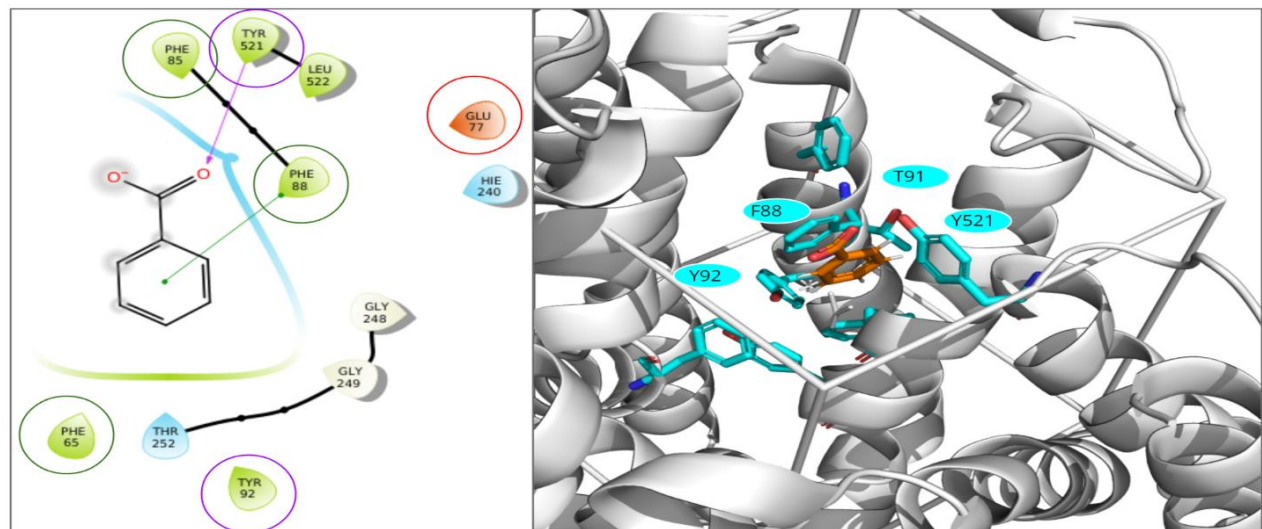


Figura 14.1.8. Grafico de interaccion sistema SMCT1:Benzoato

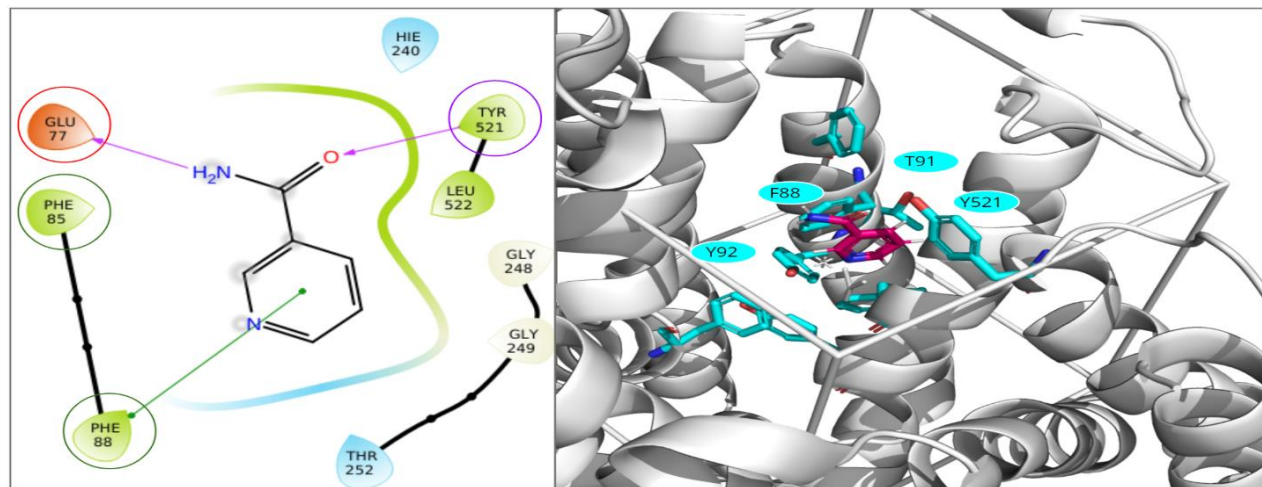


Figura 14.1.9. Grafico de interaccion sistema SMC1:Nicotinamida

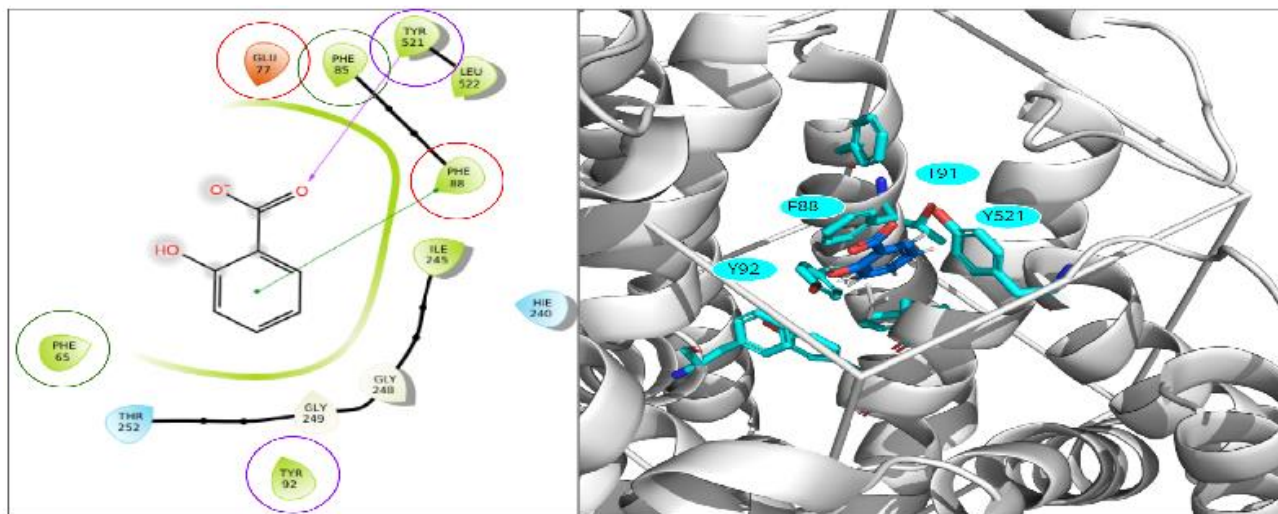


Figura 14.1.10. Grafico de interaccion sistema SMCT1:2-Pirazinecarboxilato

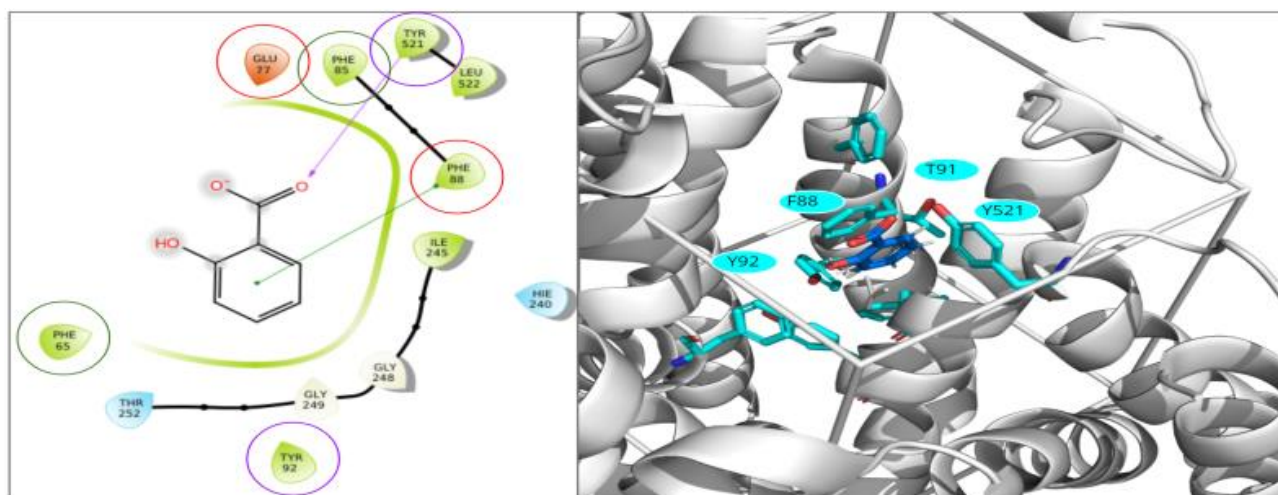


Figura 14.1.11. Grafico de interaccion sistema SMCT1:Salicilato

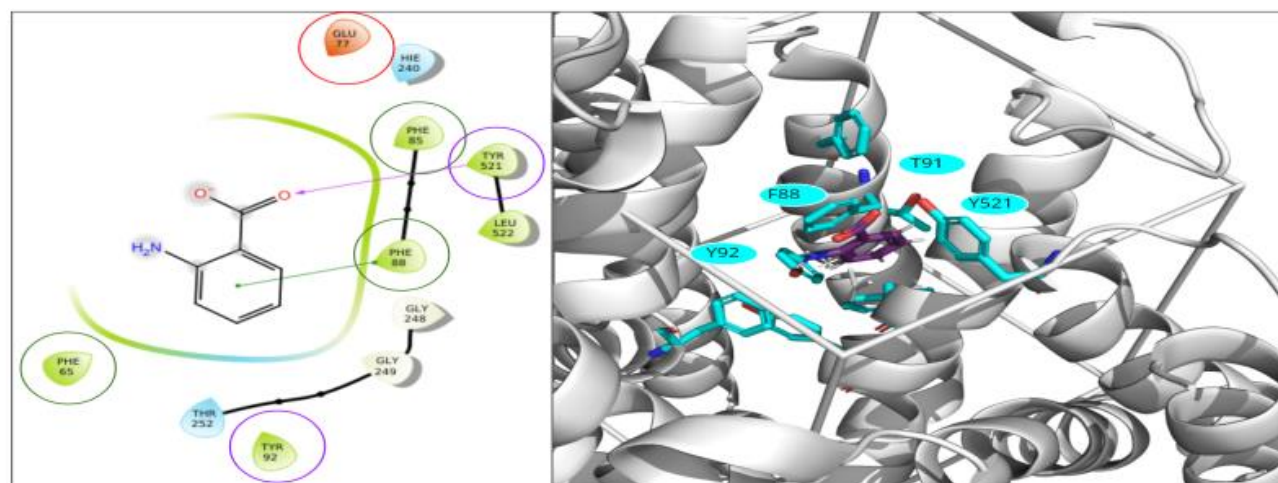


Figura 14.1.12. Grafico de interaccion sistema SMCT1:O-aminobenzoato

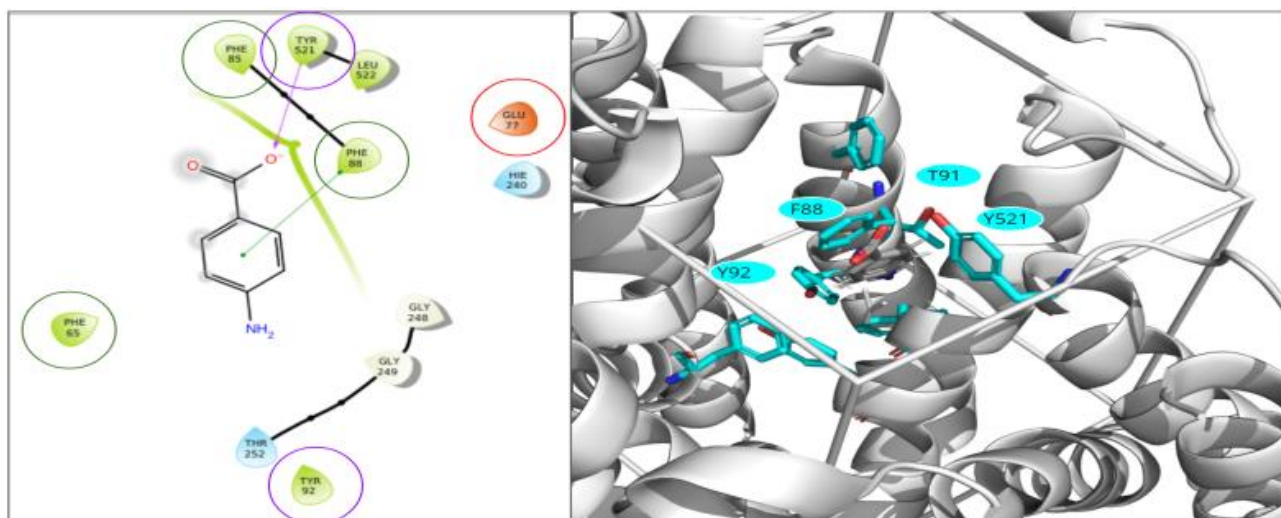


Figura 14.1.13. Grafico de interaccion sistema SMCT1:2-P-aminobenzoato