

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Facultad de Medicina Mexicali**



**Maestría en Ciencias de la Salud**

---

**MODULACIÓN ESTRUCTURAL DE DOMINIOS DE  
AMILINA MEDIADA POR LIPIDOS**

---

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:**

**Q.F.B Israel Martínez Navarro**

*Director de tesis:*

**Dr. Víctor Guadalupe García González**

*Mexicali, Baja California de Noviembre 2018*

# Índice

---

Página

## Contenido.

### 1. Marco teórico

#### 0. Resumen

1.1 Antecedentes	1
1.2 La amilina	2
1.3 Lípidos de membrana y su importancia	3
1.4 Cambios conformacionales dependientes de lípidos	6
1.5 Biomimética	8

### 2. Planteamiento del problema

3.0 Justificación	9
4.0 Hipótesis	10
5.0 Objetivo general	10
6.0 Objetivos específicos	10

### 7. Materiales y métodos

7.1 Síntesis de lípidos	11
7.2 Preparación de lípidos	11
7.3 Síntesis de péptidos	11
7.3.1 Uso de algoritmos en la agregación peptídica	10
7.3.2 Espectrofotometría del enlace peptídico y rojo Congo	13
7.3.3 Caracterización por fluorescencia	14
7.3.4 Espectroscopia de dicroísmo circular	14
7.3.5 Microscopía Electrónica de transmisión	15
7.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida	15
7.5 Cultivo celular	15
7.6 Ensayos de viabilidad	16

<b>8.</b>	<b>Discusión y resultados</b>	
8.1	Caracterización de variantes mediante fluorescencia	16
8.1.1	Caracterización por Dicroísmo Circular	18
8.1.2	Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	20
8.2	Efecto del ambiente lipídico en la estructura secundaria	23
8.2.1	Modulación de PC por espectrofotometría a 218 nm y 494 nm	24
8.2.2	Modulación de PC sobre las variantes por fluorometría con tioflavina	25
8.3	Modulación de colesterol sobre las variantes por espectrometría	26
8.3.1	Modulación de colesterol sobre las variantes por fluorometría	28
8.4.	Modulación de la PS sobre los dominios carboxilo y amino de IAPP	30
8.4.1	Modulación de PS sobre las variantes por fluorometría	31
8.4.2	Caracterización con PAGE de gradiente:	33
8.4.3	Nucleación de las variantes con respecto al tiempo	34
8.4.4	Prueba de viabilidad celular de PS con las variantes de IAPP	36
8.4.5	Estímulo y expresión de proteínas en células RIN m5F	38
8.5	Caracterización de variantes con fosfatidilglicerol (POPG)	39
8.5.1	Caracterización de POPG por fluorescencia con tioflavina T	41
8.5.2	Prueba de viabilidad celular de POPG con las variantes de IAPP	43
<b>9.</b>	<b>Conclusión</b>	44
<b>10.</b>	<b>Perspectivas</b>	45
<b>11.</b>	<b>Referencias</b>	46
<b>12.</b>	<b>Anexos</b>	52

## Abreviaturas

<b>A25</b>	Análogo de alanina en la posición 25.
<b>ATF6<math>\alpha</math></b>	Factor de activación de la transcripción 6
<b>CETP</b>	Proteína transferidora de ésteres de colesterol.
<b>CHOP</b>	Proteína homóloga al factor de transcripción C/EBP
<b>DC</b>	Dicroísmo circular.
<b>DM1</b>	Diabetes tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes tipo 2
<b>F23G</b>	Análogo de fenilalanina por glicina en la posición 27
<b>F23I</b>	Análogo de fenilalanina por isoleucina en la posición 23
<b>F23L</b>	Análogo de fenilalanina por leucina en la posición 23
<b>F23R</b>	Análogo de fenilalanina por arginina en la posición 23
<b>hIAPP</b>	Polipéptido de los islotes amiloides humano.
<b>H18R</b>	Análogo de histidina por arginina en la posición 18
<b>IAPP</b>	Polipéptido de los islotes amiloides. (Amilina)
<b>I26A</b>	Análogo de Isoleucina por alanina en la posición 26
<b>L27Y</b>	Análogo de Leucina por tirosina en la posición 27
<b>LPA</b>	Ácido lisofosfatídico.
<b>L27H</b>	Análogo de la leucina por histidina en la posición 27
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>PA</b>	Ácido fosfatídico.
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>POPG</b>	Fosfatidilglicerol
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico.
<b>SEM</b>	Microscopio electrónico de barrido.
<b>Sn- #</b>	De numeración estereoespecífica.
<b>S20G</b>	Análogo de serina por glicina en la posición 20
<b>S28</b>	Análogo de la serina en la posición 28
<b>S29</b>	Análogo de serina en la posición 29
<b>S29P</b>	Análogo de serina por prolina en la posición 29
<b>SPR</b>	Resonancia de plasmones de superficie.
<b>SUVs</b>	Vesículas unilamelares pequeñas
<b>ThT</b>	tioflavina. T
<b>TEM</b>	Microscopía de transmisión electrónica.
<b>UPR</b>	Respuesta a proteínas desplegadas
<b>V17D</b>	Análogo de valina por aspartato en la posición 1
<b>V23G</b>	Análogo de la Valina por glicina en la posición 23

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

“MODULACIÓN ESTRUCTURAL DE DOMINIOS DE AMILINA  
MEDIADA POR LIPIDOS”

**Autor de tesis:**  
**QFB Israel Martínez Navarro.**

**Tutor y Director de Tesis**  
**Dr. en C. Victor Guadalupe García González**  
Profesor-Investigador  
Facultad de Medicina Mexicali, UABC  
Mexicali, Baja California

**Asesor**

Comité de tesis:

Dra. Ana Gabriela Leija Montoya Facultad de Medicina Mexicali, UABC.

Dr. Raúl Díaz Molina, Facultad de Medicina Mexicali, UABC.

Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida. Instituto de Ingeniería de la UABC.

## Resumen

El polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) o amilina humana es un péptido de 37 aminoácidos sintetizado y co-secretado junto con la insulina por las células beta pancreáticas, cuya función es regular el vaciamiento gástrico, reducir la acción del glucagón y promover la acción de la leptina previniendo los picos de hiperglucemia. La IAPP humana es una hormona que bajo condiciones fisiológicas mantiene una carga positiva y una alta tendencia a la formación de estructuras secundarias-beta y oligómeros que pueden conducir a la formación de estructuras amiloides, sin embargo en otras especies, por ejemplo aves y reptiles existen variantes que no presentan ese comportamiento, es por ello que la amilina representa un modelo particularmente favorable para investigar el impacto de la carga electrostática en la fibrilación y su posible interacción con lípidos de membrana; tal es el caso de la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, y del colesterol, los cuales pueden estar relacionados con el fenómeno de agregación. De manera que su caracterización podría ser estudiada mediante técnicas bioquímicas de espectrometría, fluorescencia que evalúen cambios en su estructura, en un modelo celular representativo. Por lo tanto, comprender a detalle las interacciones entre las proteínas con potencial amiloidogénico y las membranas es esencial para dilucidar los mecanismos de citotoxicidad que podrían ser extrapolados al diseño de terapias contra la amiloidosis. En el presente trabajo se proponen dos variantes del fragmento C-ter de la amilina, identificados como F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A elegidos a partir de un estudio in silico a través de 240 especies, los cuales dentro de los criterios de selección fueron los que presentaron menor tendencias a la agregación de tipo amiloide. Se evaluaron los cambios conformacionales asociados con el plegamiento anómalo y la agregación de dichas variantes mediante ensayos in vitro con espectroscopía del enlace peptídico y ensayos con rojo-Congo, así como el ensayo de fluorescencia-ThT, para posteriormente realizar pruebas de viabilidad celular. En el trabajo experimental se determinó que en un sistema lipídico neutro con PC y Colesterol la variante F<sub>23</sub>R no presenta cambios estructurales significativos hacia la formación de estructuras beta, sin embargo la variante I<sub>26</sub>A presentó un comportamiento fisicoquímico muy similar al dominio C-ter nativo de la IAPP, con una alta tendencia a la formación de estructuras fibrilares. Por otra parte, se determinó que existe una importante interacción entre la PS y la variante F<sub>23</sub>R al inducir cambios estructurales hacia la formación de estructuras-beta, este comportamiento se comparó con un sistema lipídico

de tipo aniónico similar, específicamente con fosfatidilglicerol encontrándose el mismo comportamiento.

En base al presente estudio se estableció que la relación lípido- péptido hacia la formación de estructuras secundarias de tipo amiloide está condicionada al tipo, la concentración y la carga electrostática que presenta el lípido de membrana.

## 1.1 Antecedentes

La diabetes es una enfermedad crónica que ocurre cuando el cuerpo no puede producir la suficiente cantidad de la hormona insulina o bien no puede utilizarla eficazmente, ya que esta hormona permite a las células insulino-dependientes captar la glucosa y utilizarla como energía. Para su estudio se ha clasificado en diabetes tipo 1, tipo 2 y gestacional [1].

La diabetes tipo 1 (DM1) es provocada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensa del cuerpo ataca las células-beta productoras de insulina en el páncreas, como resultado, el cuerpo ya no puede producir la insulina que necesita. Por su parte en la diabetes tipo 2 (DM2) se presenta cuando el cuerpo es capaz de producir insulina pero se vuelve resistente a ella, de modo que la insulina es ineficaz, con el tiempo, los niveles de insulina pueden llegar a ser insuficientes. Tanto la resistencia, como la deficiencia de insulina pueden llevar a una hiperglicemia. Y por último la diabetes gestacional es un estado en el que la mujer cursa por hiperglucemia y suele ocurrir a partir de la semana 24 de embarazo [1]. Actualmente la diabetes ocupa el segundo lugar de casos de muerte en México y el sexto a nivel mundial [1, 2].

Por otra parte la amiloidogénesis es un proceso debido al depósito anómalo de proteínas formado primordialmente por estructuras beta laminares las cuales se acumulan a nivel extracelular y pueden encontrarse en distintos órganos y tejidos, sin embargo éstas no tienen un papel estructural, de apoyo o motilidad, pero está asociada al desarrollo de distintas enfermedades como la DM2 [3]. Si bien la insulina y la amilina, trabajan en conjunto para mantener un estado de normo glucemia, numerosos estudios han encontrado una importante relación entre la amiloidogénesis y la DM2. La deposición excesiva a nivel intra y extracelular de oligómeros solubles y fibras insolubles de amilina. Éstos importantes oligómeros posteriormente desencadenan la disfunción de las células beta pancreáticas [4]. Múltiples factores como una dieta rica en lípidos saturados y niveles elevados de colesterol sérico pueden conducir a un estado de lipotoxicidad, provocando cambios fisiológicos que pueden afectar al metabolismo de proteínas, las cuales activan factores de transcripción a nivel del retículo endoplásmico (RE) como la proteína homóloga al factor de transcripción C/EBP (CHOP) y el factor de

activación de la transcripción 6 (ATF6 $\alpha$ ) que ayudan a contrarrestar el estrés celular. Sin embargo bajo un estímulo crónico pueden conducir a la disfunción celular [5].

## 1.2 Amilina

La amilina o polipéptido amiloide de los islotes (IAPP), es un péptido de 37 aminoácidos sintetizado en las células beta pancreáticas y, procesado en el aparato de Golgi. Además es almacenado y, co-secretado en el medio extracelular junto con la insulina [6]. La IAPP ralentiza el vaciado gástrico, participa en el control de la homeostasis de la glucosa y funciona como inhibidor de la liberación del glucagón. También, ha sido descrito como un sensibilizador al sinergizar la función de la leptina en tejidos periféricos [7]. Aunado a su función hormonal, la amilina también modula importantes efectos parácrinos y autócrinos en el páncreas, al controlar al glucagón y la liberación de insulina de las células  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente [8].

El IAPP plasmático maduro, es producido a partir de la preproamilina, compuesta de 89 residuos [9]. Éste es procesado en el aparato de Golgi, en los gránulos de secreción de insulina. A continuación es cosecretado junto con ella en respuesta a los mismos estímulos [10]. En pacientes sanos, las concentraciones de amilina basales varían de 2-13 pmol/L; sin embargo, durante un periodo posprandial puede elevarse hasta 5-17 pmol/L [11, 12]. En pacientes que sufren de diabetes mellitus tipo 1 (DM1), los niveles pueden estar disminuidos debido al deterioro en la funcionalidad de las células beta, con respecto a pacientes con resistencia a insulina en donde puede ser mayor a 20 pmol/L [13]. Se ha propuesto que cerca del 90% de las células beta de pacientes con DM2 presentan depósitos amiloides [14]. El envejecimiento es otro factor que está implicado en la disminución progresiva de la relación insulina/amilina [15]. Así mismo la agregación de amiloides de la hIAPP está asociada con la disminución de la cantidad, la funcionalidad y deterioro de las células  $\beta$ , por lo tanto puede conducir a la apoptosis celular [14, 16]. En un análisis *in vitro* se ha reportado que la agregación de la IAPP se podría acelerar debido a la interacción con bicapas lipídicas, especialmente formadas por fosfolípidos aniónicos [17-21]. Existen estudios que reportan la formación de poros en membranas celulares, debido a la acumulación de especies oligoméricas intracelulares provocando una tensión y deformación mecánica en la curvatura de dichas membranas. Lo que podría resultar en la apertura de canales de calcio, lo cual puede conducir a una condición de estrés de retículo endoplásmico (RE) inducido por la hIAPP, y la aparición de un mecanismo denominado respuesta a proteínas desplegadas (UPR) que eventualmente

puede conducir a la muerte celular [22]. Respecto a la secuencia de la amilina, se conoce que varias mutaciones pueden estar relacionadas con las alteraciones de estructuras amiloides *in vivo*, por ejemplo la mutación S<sub>20</sub>G se ha descrito en la población asiática, estando asociada con casos prematuros de DM2 y acelerando la formación de estructuras amiloides [12, 23-25]. Igualmente, se han reportado variantes genéticas en poblaciones maoríes de Nueva Zelanda [25].

Sin embargo, la amilina derivada de algunas especies como la rata, no produce estructuras o fibras amiloides *in vivo*. La diferencia entre la secuencia humana y de la rata está limitada a seis aminoácidos, cinco de ellos localizados entre los residuos 23-29. En esta región, las secuencias de rata contienen tres prolinas (25, 28 y 29), condición que puede interrumpir la inducción de una estructura secundaria beta, disminuyendo el proceso de nucleación [26]. Bajo este concepto, se desarrolló el acetato de pramlintida, un análogo molecular de la amilina, el cual es un fármaco que dentro de sus principales funciones es la supresión del glucagón y ralentizar el vaciado gástrico [27]

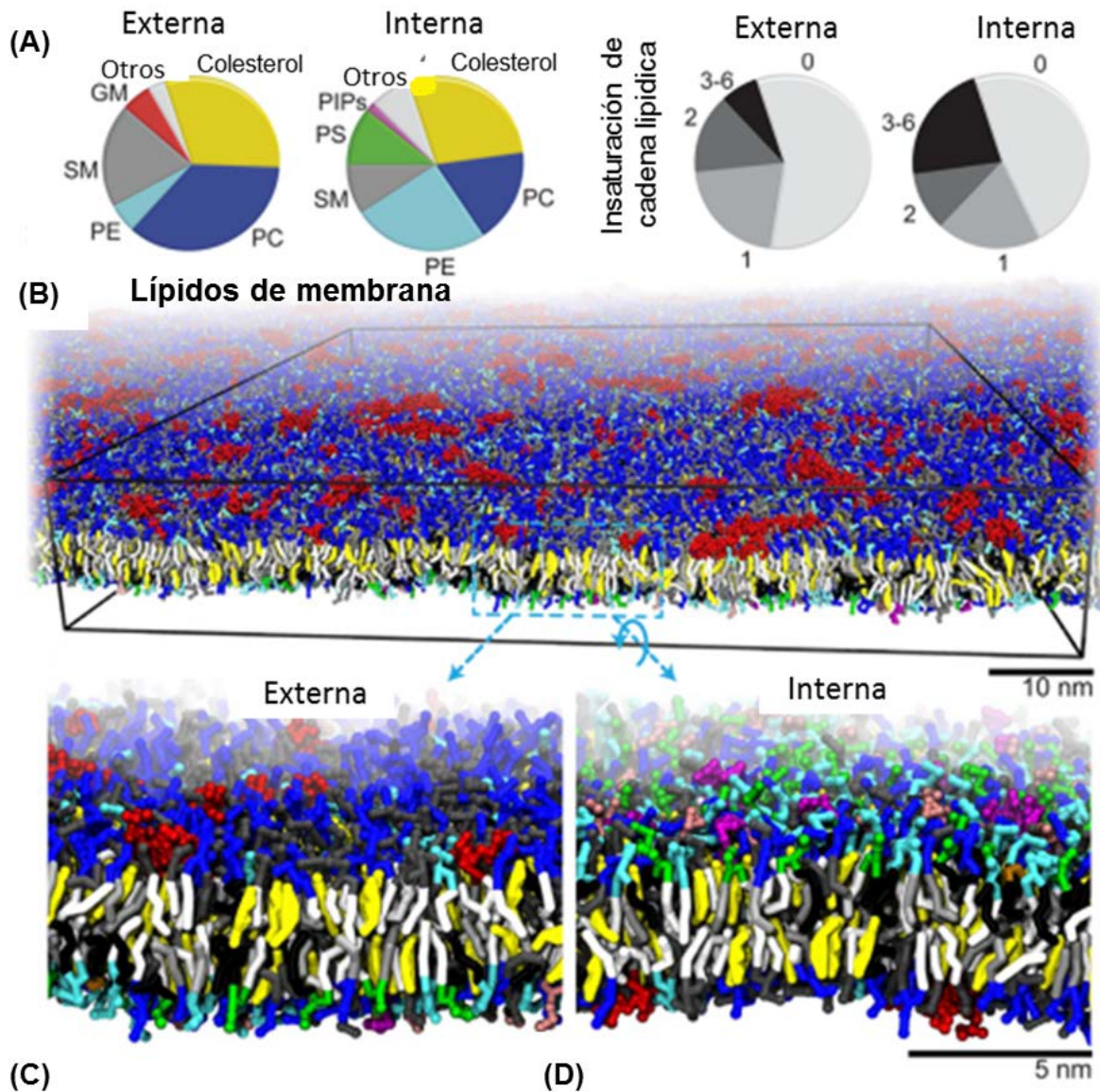
Cabe señalar que una característica específica en el diseño de pramlintida, es el cambio en los residuos A<sub>25</sub>, S<sub>28</sub> y S<sub>29</sub> por prolinas, lo cual confiere una baja tendencia a la formación de estructuras amiloides. En la DM1, la administración de pramlintida ha sido usada junto con la insulina en el tratamiento de pacientes con problemas en la regulación de los niveles de glucosa [27].

### **1.3 Lípidos de membrana**

La membrana plasmática es una estructura dinámica en el mantenimiento de las funciones celulares, ya que juega un papel muy importante en diversos procesos como el transporte y permeabilidad selectiva de iones y moléculas, así como en funciones de excitabilidad, movilidad, diferenciación, exocitosis, reconocimiento intercelular y transducción de señales extracelulares [28]. Estudios recientes revelan que la membrana plasmática interna de las células se compone de aproximadamente un 20% de lípidos aniónicos que proporcionan cargas negativas (campo eléctrico estimado en 5V / cm), generando un potencial de membrana [29]. Dependiendo del tipo de célula en estudio, ha sido ampliamente demostrado que existe una diferencia en la composición entre la monocapa externa y la interna de la membrana plasmática, siendo la fosfatidilcolina y esfingomielina las de mayor predominio en su capa externa mientras que la monocapa interna preferentemente incluye fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, las cuales ejercen

una atracción permanente o transitoria de moléculas catiónicas citosólicas (Figura 1) [30]. Así mismo, mediante estudios *in vitro* se ha evidenciado que la disminución del contenido de fosfatidiletanolamina (PE), uno de los principales lípidos de la membrana interna en células de neuroblastoma reduce la toxicidad del péptido A $\beta$  amiloidogénico implicado en la enfermedad de Alzheimer y su posible asociación con especies oligoméricas altamente citotóxicas [31]. La amilina humana bajo condiciones fisiológicas es considerada un péptido catiónico, esta característica podría ser un factor en la interacción lipídica con PS cuya carga neta es de -1, por lo que se considera un fosfolípido aniónico [17, 19].

En este sentido, la PC no tiene una carga neta, la cual adopta la forma de zwitterion dipolar, en cambio la PE tiene una carga parcial positiva a un pH fisiológico. Desde un punto de vista estructural, la PC contiene principalmente ácido palmítico (16:0) o ácido esteárico (18:0) en la posición sn-1 y primordialmente ácidos grasos insaturados de 18 carbonos como el oleico, linoleico o linolénico en la posición sn-2 [32].



**Figura 1** | Distribución de fosfolípidos y colesterol en la membrana lipídica. (A). Porcentaje constitutivo de los principales lípidos de membrana plasmática en sus monocapas externa e interna así como la proporción de insaturaciones. Fosfatidilcolina (PC), colesterol, fosfatidilserina (PS), esfingomielina (SM) fosfatidilinositol mono, di y tri fosfato (PIPs), gangliosidos [33] (B). Imagen panorámica de una sección de membrana. (C) y (D) Segmento de membrana externa e interna respectivamente. Modificado de Helgi I. Ingolfsson et al (2014) Lipid Organization of the Plasma Membrane.

De forma importante, se ha descrito en estudios *in vitro* que las membranas aniónicas promueven la formación de estructuras amiloides, por lo que sistemas altamente cargados tienen un efecto más alto en la internalización de lípidos [34]. Sin embargo, no se ha caracterizado el efecto sobre los diferentes dominios de la amilina, donde también se conoce que las cadenas de glicosaminoglicanos del proteoglicano heparán sulfato, tienen efectos positivos en la formación de estructuras amiloides [35, 36].

Actualmente se conoce que las membranas de las células beta pancreáticas son reducidas en colesterol [37] [38], en contraste se ha demostrado que los altos niveles de colesterol pueden promover la agregación como sucede con el péptido A $\beta$  en la enfermedad de Alzheimer [39]. Como ya se mencionó anteriormente es importante resaltar que existe una aceleración en el proceso de amiloidogénesis, en aquellas membranas aniónicas, como sucede con la PS la cual provee de sitios de anclaje donde los agregados amiloides pueden iniciar el proceso de nucleación desencadenando la citotoxicidad y a la postre la disrupción de la membrana plasmática[40]. En relación con el colesterol y los fosfolípidos, los ácidos grasos libres (FFA's) juegan un papel importante en la función de las células beta, tal es el caso de los ácidos palmítico, mirístico y esteárico los cuales en exceso pueden conducir a un estado de lipotoxicidad causando la distensión del RE. En contraste a esto, cabe señalar que los ácidos grasos insaturados (UFA's) como el ácido oleico y palmitoléico pueden proveer de un efecto protector en las células beta atenuando el efecto citotóxico de los primeros [5]

#### **1.4 Cambios conformacionales dependientes de lípidos**

Se ha reportado que bajo condiciones específicas, cambios conformacionales en dominios específicos de proteínas están asociados con la formación de estructuras amiloides [41]. De la misma forma, la interacción entre especies oligoméricas en dominios específicos de la membrana celular está conectada con los efectos citotóxicos [24, 41]. En este caso, el tipo y la composición de lípidos puede ser un factor crucial en la interface hidrofílica/hidrofóbica como sitio de reconocimiento que puede modular posibles cambios conformacionales a nivel de la estructura secundaria [23, 41, 42]. En este sentido, se ha descrito que moléculas como el ácido lisofosfatídico (LPA), un fosfolípido derivado de la acción enzimática de fosfolipasas extracelulares a partir de precursores como la lisofosfatidilcolina o el ácido fosfatídico (PA), promueven en la proteína modelo  $\beta$ 2-microglobulina la formación *in vitro* de fibras amiloides [43, 44].

Actualmente un número significativo de enfermedades causadas por la agregación proteica han sido descritas, tales como Alzheimer y Creutzfeld-Jakob, la diabetes tipo II y la encefalopatía esponjiforme bovina. De estos, aproximadamente 40 enfermedades están asociadas con la deposición extracelular e intracelular de péptidos y proteínas [45]. No obstante, el auto-ensamblaje de estructuras fibrilares no es una característica restrictiva de un grupo reducido de péptidos y proteínas con patrones específicos en sus

secuencias de aminoácidos o estructuras tridimensionales, ya que en los últimos quince años se ha comprobado que varias secuencias peptídicas no están relacionadas únicamente con enfermedades a pesar de su propiedad para llevar a cabo la formación de estructuras amiloides. Aunque también se ha encontrado la adaptación de procesos fisiológicos específicos acoplados a la formación de amiloides, por ejemplo durante la polimerización de moléculas precursoras de melanina en los melanocitos [46]. La formación de estructuras amiloides se ha considerado una propiedad que podría ser genérica a muchas cadenas polipeptídicas y en algunos casos directamente relacionados con una función fisiológica [47].

Por varios años, el grupo de trabajo de los autores se ha interesado en el estudio de la relación estructura-función de proteínas que participan en la unión a lípidos. Por ejemplo, de forma paralela a los cambios encontrados en la estructura secundaria de regiones específicas de varias de estas proteínas tales como la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) así como su isoforma I (CETPI) [47-49], se ha propuesto la posibilidad de que dominios específicos responden a cambios en el microambiente que los rodea, y a través de transiciones específicas desorden-al-orden estos cambios pueden actuar como interruptores moleculares que desencadenan la función [42, 50].

Debido al estudio experimental de péptidos derivados del N y C-terminal de la amilina humana, los autores han encontrado que el dominio C-terminal está involucrado en la formación de estructuras amiloides bajo un sistema lipídico basado en vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) formadas a partir de lípidos que emulan los constituyentes de membranas como son la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y colesterol. Estos estudios se realizaron con espectrometría del enlace peptídico a 218 nm, así como la técnica de rojo Congo, microscopía de epifluorescencia con tioflavina T, y dicroísmo circular, así como algunas técnicas bioquímicas de electroforesis en geles nativos. Los resultados sugieren que los fragmentos de amilina podrían presentar un comportamiento diferencial bajo la interacción con lisofosfolípidos como el ácido lisofosfatídico (LPA), con respecto a algunas secuencias amiloides de referencia como el péptido amiloide ( $A\beta$ ). Asimismo, se pudo determinar que la formación de estructuras fibrilares es un evento rápido y que puede aumentar hasta un punto máximo en relación a la concentración, de tal manera que este estudio acerca a los autores al entendimiento de los cambios conformacionales a nivel molecular en la amilina y su interacción con lípidos de membrana. Sin embargo hacen

falta más estudios que ayuden a entender las posibles transiciones estructurales en la amilina dependientes de lípidos.

## 1.5 Biomimética

Mediante un enfoque natural basado en la estructura, la biomimética, que es descrita como la adaptación de modelos inspirados en la biología, ha provisto la base para la producción de nuevos sistemas de materiales en el área biomédica. De manera que para extrapolar el concepto de biomimética en la amilina, es necesario el entendimiento y la estructura de las secuencias de diferentes especies [51, 52]. La tendencia de cientos de organismos de formar agregados de amilina no ha sido completamente analizada, de manera que el estudio de diferentes secuencias de amilina puede proveer la base para el eventual desarrollo de secuencias mejoradas, que puedan evitar la activación de mecanismos de agregación, considerando la optimización de sus propiedades estructurales [53].

A través del análisis de 240 secuencias usando múltiples alineamientos, el dominio N-terminal de la amilina humana se ha identificado como una secuencia conservada en una amplia variedad de organismos, mientras que el C-terminal presenta homología sólo en algunas especies de homínidos (comunicación personal), de hecho en la región 18-32 residen las mayores variaciones entre especies. Basado en una amplia caracterización *in silico*, a través de 240 secuencias de amilina, y mediante diferentes algoritmos de predicción de la propensión a la agregación, los autores han encontrado que las posiciones con mayores frecuencias de variación son la H<sub>18</sub>R en 209 secuencias, S<sub>29</sub>P en 205, L<sub>27</sub>Y en 140, F<sub>23</sub>I en 135 y F<sub>23</sub>L en 61 secuencias. Sin embargo, existen cinco variantes que reducen drásticamente la propensión a la agregación: V<sub>17</sub>D, F<sub>23</sub>R, L<sub>27</sub>H, F<sub>23</sub>G y V<sub>32</sub>G [55]. Es importante resaltar que la región 18-32 es clave para entender el proceso de agregación sobre el análisis de la secuencia de aminoácidos, y a través del uso de biomimética, puede ser posible alcanzar un diseño optimizado de la secuencia de IAPP. En esta secuencia el factor de agregación pueda ser bajo, así como también con las menores modificaciones como se plantea en el presente trabajo.

Mediante el uso de este tipo de herramientas, el estudio de secuencias *de novo* dirigidas al núcleo de agregación del fragmento C-ter deben ser clave para entender los mecanismos evolutivos que han regulado el plegamiento de IAPP, y eventualmente la función diferencial entre especies.

## 2.0 Planteamiento del problema

Basados en estudios *in silico* realizados por los autores [54], se ha determinado que el extremo C-terminal de la IAPP es el fragmento que presenta mayor propensión a la agregación con lípidos de membrana como la fosfatidilcolina, la cual es considerada como un fosfolípido con carga electrostática neutra bajo condiciones de pH fisiológico.

Es por ello que en el presente estudio se experimentó con algunos de los principales lípidos de membrana como la fosfatidilcolina, el colesterol y la fosfatidilserina. Esto con el objetivo de evaluar si el efecto electrostático, así como el grado de solvatación de dichos lípidos puedan desencadenar la formación de estructuras beta amiloides sobre las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A del dominio C-terminal de IAPP. El proyecto se centró en la caracterización de los dos dominios de la amilina, el amino terminal que comprende los residuos (1-20) y el carboxilo terminal que comprende los residuos (23-37). Posteriormente se experimentó con las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A.

Dichas variantes fueron elegidas debido a un extenso estudio basado en la secuencia de 240 especies, mediante el uso de algoritmos predictores de láminas beta analizados por los programas Aggrescan (Na4vSS), Pasta 2.0, además de Zyggregator. Las variantes propuestas para este estudio pertenecen a las especies *Carassius auratus* (pez dorado) para F<sub>23</sub>R y *Cyanocitta cristata*, *Cavia porcellus*, *Cryptomys damarensis* (urraca azul, cobayo y topo respectivamente) para I<sub>26</sub>A, ambas variantes localizadas en el extremo C-terminal de la amilina.

## 3.0 Justificación

Las enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2 se han relacionado con el plegamiento anómalo de proteínas, de manera que los depósitos de agregados amiloides pueden tener un papel crítico en la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, por lo tanto es importante considerar el efecto de la modulación de lípidos como la fosfatidilserina, que ejercen sobre los procesos de amiloidogénesis y específicamente la influencia del factor electrostático sobre las interacciones lípido-proteína. Es importante mencionar que algunos organismos, específicamente roedores, no presentan el fenómeno de amiloidogénesis en la amilina debido a variantes que se encuentran en el dominio C-terminal, tales como la presencia de aminoácidos como Prolina en las posiciones 25, 28 y 29, los cuales reducen el plegamiento anómalo de proteínas. Los resultados que se

podrían generar en el presente trabajo podrán servir para comprender la influencia del factor electrostático en el proceso de amiloidogénesis de la amilina.

El estudio de péptidos está siendo usado con mayor frecuencia en el desarrollo farmacológico, considerando que sus potenciales interacciones con sus proteínas blancas y su alta afinidad y especificidad pueden reducir los perfiles de toxicidad [55]. De manera que las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A podrían jugar una función importante en la protección de los amiloides al reducir el factor de agregación. El diseño de moléculas compuestas de elementos anti-estructuras beta combinados con residuos aromáticos (por ejemplo, D-Trp-ácido aminoisobutírico) han surgido como estrategias prometedoras [56] para el desarrollo de péptidos inhibidores de láminas beta en la diabetes tipo 2, que es un ejemplo de una enfermedad en la que existe un componente amiloidogénico [57].

#### **4.0 Hipótesis**

Las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A del extremo C-terminal de la amilina evitarán su agregación bajo la interacción con fosfolípidos de membrana como la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y colesterol, modulando la formación de estructuras beta con respecto a la secuencia nativa.

#### **5.0 Objetivo General**

Caracterizar los cambios estructurales del dominio C-terminal nativo y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A, así como su interacción con fosfolípidos de membrana como la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y colesterol.

#### **6.0 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la fosfatidilserina como un factor en la interacción con secuencias del dominio C-terminal nativo y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A.
- Evaluar el efecto de la fosfatidilcolina como un factor en la interacción con secuencias del dominio C-terminal nativo y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A.
- Evaluar el efecto del colesterol como un factor en la interacción con secuencias del dominio C-terminal nativo y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A.
- Evaluar el efecto del fosfatidilglicerol como un factor en la interacción con secuencias del dominio C-terminal nativo y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A.

- Caracterizar el efecto de la modulación lipídica en el dominio C-terminal y las variantes F23R e I26A sobre la viabilidad celular en un modelo de células beta pancreáticas.

## **7.0 Materiales y métodos**

### **7.1 Síntesis de lípidos**

1-hexanoil-2-hidroxi-sn-glicerol-3-Fosfocolina (liso-C6PC), la PS L- $\alpha$ -Fosfatidilserina (Lot.840032C), la PE L- $\alpha$ -phosphatidil etanolamina (Lot.840032C), POPG 1-hexadecanoil-2-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-phospho-(1'-rac-glicerol) CAS (268550-95-4) así como Colesterol (Lot. CH-102) (se obtuvieron de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Las sales y buffers se obtuvieron de J.T. Baker (Center Valley, PA).

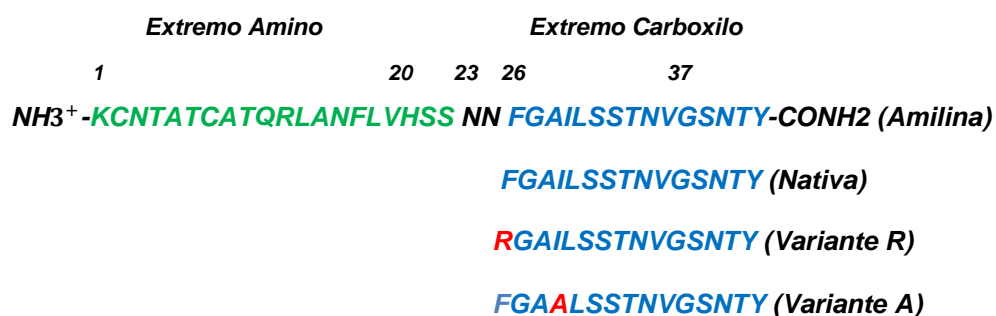
### **7.2 Preparación de lípidos**

Para la preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) se utilizó como base la PC, y se mezcló por separado con PS, colesterol y fosfatidilglicerol POPG bajo diferentes concentraciones respectivamente. Posteriormente se secaron en cloroformo durante 1h y media con una corriente suave de nitrógeno gas y un periodo adicional de 5 h al vacío en el equipo SpeedVac (Savant). Los lípidos PC, PS y POPG se prepararon con una concentración (0.6 mg/mL) después del secado, las mezclas se resuspendieron en una solución amortiguadora a pH 7.4, para el caso de POPG se realizaron solo 2 ciclos de congelación/descongelación con nitrógeno líquido, resuspensión en vórtex entre cada ciclo y finalmente un proceso de sonicación (10 minutos en ciclos de 15 segundos a 9.5-10 watts, por 30 segundos de reposo) en el equipo Ultrasonic Homogenizer 36260 series Cole Palmer Instruments Co. Chicago. Mientras que para la PS no fueron necesarios los ciclos de congelación/descongelación, solo se realizaron 2 ciclos de sonicación. Las muestras se mantuvieron equilibradas por 1 h a 25°C y al final se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min.

### **7.3 Síntesis de péptidos**

La primera parte se direccionó al estudio de la estructura de IAPP, debido a que es una secuencia peptídica corta (37 residuos). Los péptidos derivados de la región N y C-terminal de IAPP de humano fueron sintetizados Figura 2 por la compañía (GenScript,

E.U.A.). Durante el desarrollo experimental se usaron secuencias peptídicas con una pureza mayor al 98 %. Así mismo, la concentración de los diferentes fragmentos se determinó a través de la absorbancia del enlace peptídico a 218 nm. Los péptidos liofilizados se disolvieron en agua ultrapura mili Q para ajustarse a una concentración de 60 µg/mL, a partir de la cual se realizaron las diluciones requeridas, los experimentos se realizaron en una solución amortiguadora a pH 7.4. Todas las soluciones amortiguadoras se usaron bajo una concentración de 60 µg/mL para los péptidos C-ter y N-ter filtrándose a través de membranas con un poro de 0.22 µm.



**Figura 2** | La figura representa la secuencia de aminoácidos que conforman a la amilina humana, así como la propuesta de las variantes del fragmento C- Terminal del residuo 23 al 37.

### **7.3.1 Uso de algoritmos en la agregación peptídica**

A través de plataformas como Aggrescan, PASTA y Zyaggregator basadas en algoritmos para la predicción de sectores con alta propensión a la agregación de proteínas, se analizaron las secuencias de amilina de 240 especies, que permitieron elegir las variantes que se evaluaron en el presente estudio.

Utilizando como referencia la secuencia de aminoácidos de la amilina humana en formato FASTA se hizo uso de la plataforma Aggrescan la cual permitió calcular y comparar el valor promedio de cada residuo con una base de datos de 57 proteínas amiloidogénicas, provenientes de otras especies animales con mayor y menor propensión a la agregación señalando los sitios con mayor tendencia a la agregación en rojo conocidos como “hot spots” [58, 59].

El programa PASTA 2.0 usa la energía potencial del centro de la secuencia proteica, para predecir la región de formación de fibras amiloides. Esta energía se

relaciona con un umbral estricto para la detección de puentes de hidrógeno. Así también para las estructuras secundarias e intrínsecamente desordenadas, los predictores fueron entrenados para tomar la secuencia de aminoácidos usando BRNNs (Bi-directional Recursive Neural Networks). PASTA tiene una base de datos que consta de 424 péptidos, de los cuales 149 se agregan y 275 no lo hacen, además tiene una base de datos para detectar regiones de proteínas, en la cual se encuentran 33 proteínas con 1260 regiones agregativas, provenientes de la literatura [58].

Por último el programa Ziggagregator utiliza un método para predecir las propensiones a la agregación de proteínas amiloides, que toman diferentes factores intrínsecos de referencia, como algoritmos que calculan la propensión intrínseca de agregación de una secuencia, y estos factores son determinados de manera simultánea usando técnicas de regresión. Ziggagregator usa una base de datos de 203 secuencias, lo que genera una escala de propensión a formar estructuras en hojas- $\beta$  y  $\alpha$ -hélices. [60, 61]

### **7.3.2 Espectrofotometría del enlace peptídico y rojo-Congo**

A través de las mediciones de absorbancia a 218 nm en el UV lejano se evaluó la estructura secundaria de los péptidos ajustándose a una concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$  en sus diferentes condiciones, siendo un parámetro indicativo de la presencia de cambios conformacionales a nivel de estructura secundaria [62]. Las mediciones se realizaron mediante un Smart spectrophotometer de BioRad, utilizando una cubeta de cuarzo, con un volumen de muestra de 200  $\mu\text{L}$ . Todas las muestras se midieron por triplicado, los datos fueron capturados en un sistema de cómputo utilizando el programa hyperterminal, para después ser exportados al programa Excel y graphPad Prism para el procesamiento de los datos. Se emplearon concentraciones conocidas de péptido registrando las absorbancias cada 1 nm dentro de un rango de 200-240 nm, Los espectros se corrigieron con los espectros de las soluciones control correspondientes.

Las mediciones con rojo Congo se realizaron bajo una longitud de onda de 494 nm, técnica que permite caracterizar cambios conformacionales sobre la amilina, particularmente la formación de estructuras de tipo  $\beta$ , debido al cambio de birrefringencia. Se utilizó un Smart spectrophotometer de BioRad, con una celda de cuarzo, el volumen de muestra fue de 200  $\mu\text{L}$ . Todas las muestras se midieron por triplicado, y se capturaron

los datos utilizando el programa hyperterminal, para después ser exportados al programa Excel y GraphPad Prism para el procesamiento de los datos.

La asociación de rojo-Congo (RC) con estructuras amiloides bajo luz polarizada produce una birrefringencia verde-amarilla característica, y un desplazamiento típico del máximo de absorción de ~ 490 nm a ~ 540 nm [63].

Para explicar los mecanismos de unión de fibrillas a RC se han propuesto dos hipótesis, la primera sugiere que las interacciones iónicas e hidrófobas entre el colorante y la proteína, favorecen la alineación de la molécula de RC dentro de los surcos y a lo largo del eje de la fibrilla de la estructura amiloide [64], mientras que la segunda, postula que las moléculas de RC se orientan perpendicularmente en la dirección de la fibrilla, intercalándose entre las cadenas  $\beta$  [65] [66]. De lo anterior, diversos estudios consideran que la prueba espectroscópica por RC es una forma objetiva y confiable para detectar fibrillas amiloides [67].

### **7.3.3 Caracterización por fluorescencia**

Para confirmar la presencia de estructuras amiloides por medio de la técnica de fluorescencia, eligiendo el fluoróforo tioflavina T (ThT). Las mediciones de fluorescencia se realizaron a 25 °C en un fluorómetro Cary Eclipse, utilizando una longitud de onda ( $\lambda$ ) de excitación a 450 nm, y un rango de emisión de 460 a 610 nm. Las muestras se prepararon a un volumen final de 220  $\mu$ L, posteriormente se incubaron por 12 h a 37°C, antes de realizar la medición se agregó 1  $\mu$ L de ThT 1 mM por cada 50  $\mu$ L de muestra, y se homogenizó con ayuda de agitación, para después realizar la medición. Todas las muestras se midieron por triplicado; para el procesamiento de los resultados obtenidos se exportaron a la plataforma de Excel y GraphPad Prism.

### **7.3.4 Espectroscopía de dicroísmo circular**

Los espectros de DC se registraron en un espectropolarímetro AVIV62DS (AVIV instruments) a 25°C en un rango de 190-260 nm. Los experimentos se llevaron a cabo a una concentración de 120  $\mu$ g/mL de péptido en una celda de cuarzo de 0.1 cm, usando un tiempo promedio de integración de 2.5 s, e incrementos de 1 nm. Los resultados de DC se

reportaron en valores de elipticidad molar media ( $\Theta$ , deg cm<sup>2</sup> d mol<sup>-1</sup>) considerando la corrección realizada con las soluciones base.

### **7.3.5 Microscopía Electrónica de Transmisión**

Las concentraciones de péptido se ajustaron a 60 µg/mL en buffer de fosfatos 20 µM, a pH 7.4 se tomó 2 µL de cada péptido y se colocó en rejillas para microscopía electrónica de transmisión (Formvar-Carbon de cobre y malla de 300); para posteriormente ser incubadas durante 2 min a 25°C, el exceso de líquido se eliminó con papel Whatman.. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Prime JEOL-7800F con detector de barrido electrónico de microscopía de transmisión (STEM) a 30.0 kV.

### **7.4 Electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida PAGE**

La caracterización de las interacciones de la amilina y los fosfolípidos propuestos en este estudio se realizaron a través de geles nativos de gradiente de poliacrilamida de 1-15 %, en buffer Tris-fosfatos pH 7.4. La electroforesis se llevó a cabo durante 5 h a 80 V, de acuerdo a un protocolo previamente desarrollado [68]

Esta técnica permite evaluar la posible interacción entre los fosfolípidos y la amilina, ya que se realiza bajo condiciones nativas, en donde las interacciones entre biomoléculas no se encuentran afectadas. Los geles serán teñidos con nitrato de plata y negro de Sudán, ésta última es una tinción específica para lípidos. De esta forma, el método permitió el estudio de la amilina-fosfolípidos sin que se modificaran las interacciones entre dichas biomoléculas.

### **7.5 Cultivo celular**

Se proliferaron células de insulinoma de rata (RIN m5F ATCC) en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina y Suero Fetal Bovino al 10 % (SFB). Asimismo, las células de microglía (EOC) se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 20% de medio acondicionado LADMAC (producido a partir de la línea celular LADMAC, rico en factor 1 estimulador de colonias).

## 7.6 Ensayo de viabilidad celular

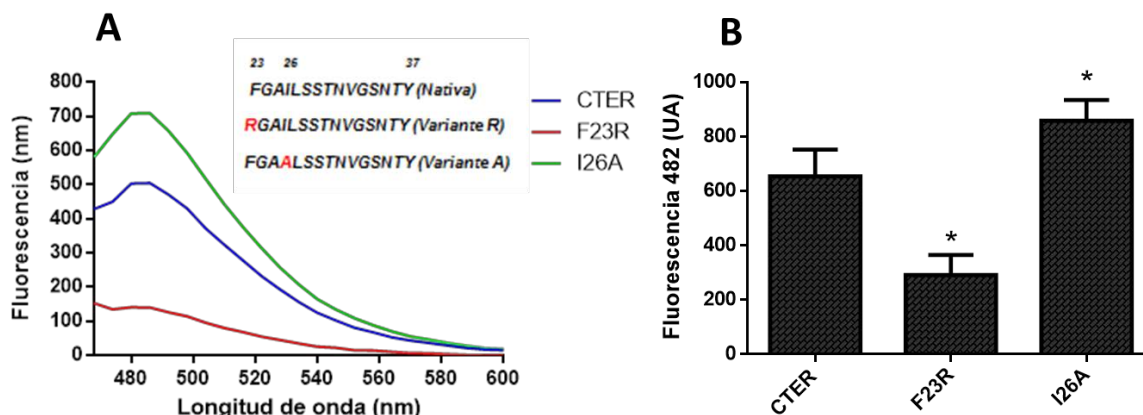
El MTT es un compuesto perteneciente a las sales de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) que al reducirse a ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano), por acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células en estudio, genera un compuesto color violeta de la familia de los formazanos insoluble en agua, el cual puede ser cuantificado por espectroscopia a 570 nm. Un aumento en la reducción de MTT refleja una mayor viabilidad celular.

La citotoxicidad inducida por los péptidos se evaluó mediante ensayos de reducción de MTT en cultivos celulares, bajo diferentes tratamientos con péptidos y lípidos. Las células se cultivaron en placas de 96 pozos ajustada a una densidad de 20,000 células/pozo y se dejaron proliferar hasta una confluencia del 90 %. A continuación, el medio de cultivo se reemplazó con medio Opti-MEM. Después de 1 h bajo esta condición, las células se incubaron bajo diferentes tratamientos, y posteriormente se procesaron de acuerdo con protocolos previos. [23].

## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Caracterización de variantes mediante fluorescencia

Con la finalidad de determinar la posible formación de estructuras amiloides, fueron evaluadas las variantes F23R e I26A con respecto al fragmento C-ter nativo de la IAPP, que comprende los residuos <sup>23</sup>(FGAILSSTNVGSNTY)<sup>37</sup>, mediante un ensayo de fluorescencia acoplado a ThT (Figura 3). El uso de ThT en soluciones peptídicas ha sido un referente para el análisis de estructuras amiloides debido a su alta especificidad, presentando una longitud de onda de emisión de 510 nm en su estado libre y de 480 nm cuando se une a estructuras de tipo beta [69], específicamente intercalándose en regiones que contienen residuos hidrofóbicos [70].



**Figura 3** | Análisis de péptidos por fluorescencia con Tioflavina T. (A). Comparativo de los espectros de emisión de fluorescencia en las variantes del fragmento C-ter de la IAPP en un rango de los 470 -600 nm. (B). Señal producida del pico máximo de emisión 482 nm por las variantes F23R e I26A con respecto al fragmento C-ter. Se presentan las medias, con una ( $P \leq 0.05$ ).

Como resultado de esta caracterización experimental se pudo determinar que la variante F23R bajo una concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$  y de pH 7.4 presentó los valores más bajos de fluorescencia con un pico a 482 nm, lo cual puede estar asociados con una menor tendencia a la formación de estructuras de tipo- $\beta$ , debido al efecto anti amiloidogénico asociado con la carga positiva de la cadena lateral de la arginina en la posición 23 que probablemente ejerce un efecto de repulsión entre los fragmentos de la variante evitando la formación de oligómeros. Se tiene un antecedente en el cual un grupo de investigadores generó un análogo de amilina IAPP sustituyendo hasta cuatro residuos de Arginina en las posiciones 23-26 [71]. Sin embargo, en nuestra propuesta la sustitución de un solo aminoácido específicamente en la posición 23 (F23R) del fragmento C-Ter de IAPP podría reducir la formación de estructuras beta *in vitro* (Figura 3A), evaluado mediante los picos máximos de fluorescencia a 482 nm. En la (Figura 3B) se evaluó la señal producida por cada una de las variantes, siendo F23R la de menor contenido de estructuras  $\beta$ . En el caso de la variante I26A contrario a lo que se esperaba, se detectó un pico ligeramente más elevado con respecto al dominio C-ter nativo. En el análisis de los parámetros fisicoquímicos de la variante I26A, se encontró una ligera similitud con el dominio C-ter de la IAPP sobre todo en los valores de hidrofobicidad y punto isoeléctrico, esto podría explicar el pico de fluorescencia más alto obtenido en la

(Figura 3 A), contrastando lo anterior, cabe destacar que para I<sub>26</sub>A el valor obtenido de Aggrescan fue de (-8.2), con una menor tendencia a generar *Hot spots* o sitios de agregación y esto a su vez sobre la formación de fibras (Tabla 1).

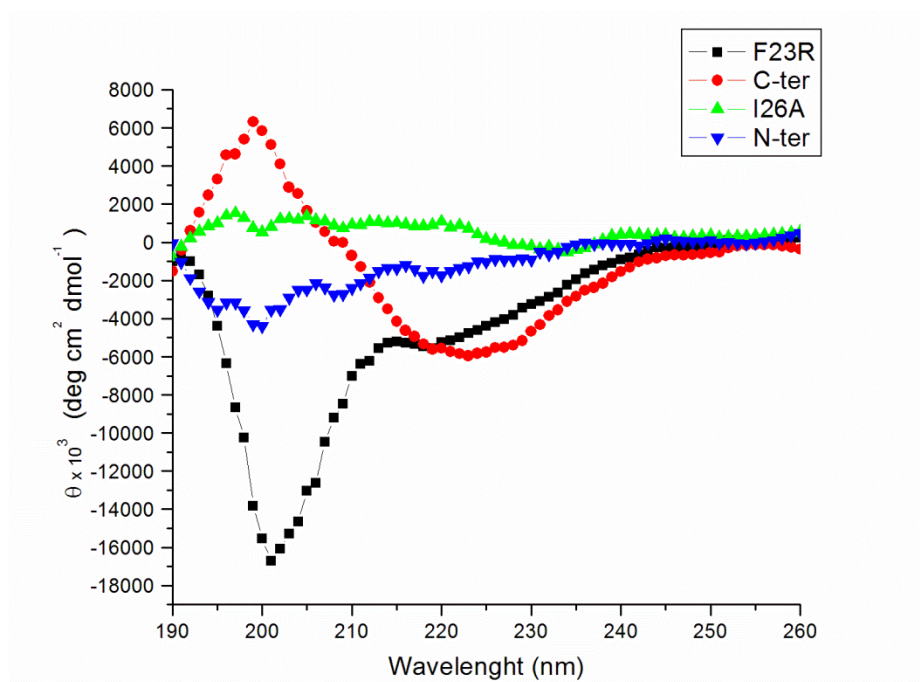
**Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del dominio C-ter de IAPP y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A**

	Secuencia	Valor de Aggrescan	Valor de Hidropatía kcal/mol	Carga a pH 7.4	Valor de Hidrofobicidad kcal/mol	pI	μH
C <sub>TER</sub>	FGAILSSTNVGSNTY	6.6	0.28	0.0	0.29	5.928	0.185
F <sub>23</sub> R	RGAILSSTNVGSNTY	-5.3	-0.207	1.0	0.212	9.843	0.042
I <sub>26</sub> A	FGAALSSTNVGSNTY	-8.2	0.1	0.0	0.239	5.928	0.134

### 8.1.1 Caracterización por Dicroísmo Circular

Para evaluar si las variantes propuestas son propensas a generar oligómeros o bien estructuras beta laminares, se seleccionó la técnica de dicroísmo circular. Esta técnica permite llevar a cabo estudios con biomoléculas orgánicas en solución, evidenciando de manera cuantitativa cambios estructurales para su función biológica, basándose en la interacción de moléculas quirales como los péptidos y proteínas bajo una luz circularmente polarizada, la cual produce la excitación de transiciones electrónicas predominantemente en los grupos amida en el espectro UV lejano (190-260 nm). Particularmente, la espectroscopia de DC es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de la estructura de proteínas, a pesar de sus limitaciones respecto a la diversidad en estructuras beta, ya sea por su orientación paralela o anti-paralela, por la presencia de giros beta en el estudio de proteínas de membrana, agregados de proteínas o fibras amiloides. [72]. Sin embargo, para el presente estudio fue una herramienta importante en la caracterización de estas variantes. En la (Figura 4), se muestran los espectros de los péptidos evaluados, que representan la estructura secundaria. En rojo se encuentra la elipticidad molar media del C-ter como control, el cual presentó un desplazamiento batocrómico en su pico máximo (~10 nm) de emisión de 195 a 200 nm y un mínimo (~29 nm) de 217 a 224 nm, lo cual es indicativo de la formación de estructuras de tipo beta.

Para el N-ter tuvo un máximo a 190 nm y dos mínimos a 195 y 200 nm, sugiriendo la presencia mínima de estructuras de tipo- $\alpha$ -hélice (máximo a 190 y dos mínimos a 208 y 222 nm), aunque la señal de DC es baja. Mientras que para la variante F23R (curva negra) se obtuvo un pico máximo a 190 nm y dos mínimos a 202 y 219 nm, característico de estructuras alfa-helicoidales con estructuras beta, tal efecto pudo ser producido por la diferencia en las propiedades fisicoquímicas del aminoácido fenilalanina por arginina. Por último, la variante I26A presentó un comportamiento atípico en el gráfico, el cual no se ajusta a ninguna estructura secundaria, lo cual pudo deberse a un tipo de agregación amorfa. Considerando los resultados anteriores sobre la variante I<sub>26</sub>A, solamente se empleó en experimentos específicos, tomando en cuenta también que mostró problemas en la solubilidad bajo las presentes condiciones experimentales (Figura 4).

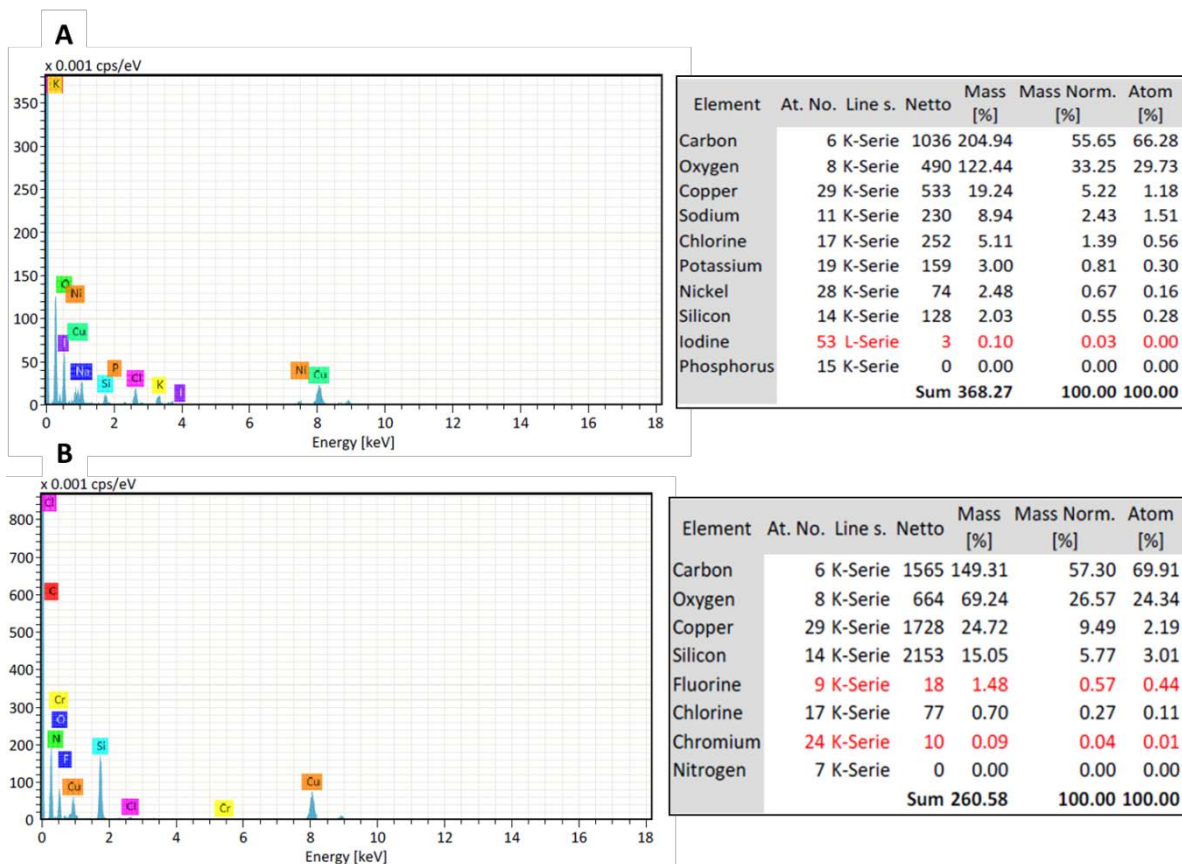


**Figura 4|** Comparación de los distintos espectros de dicroísmo circular [73] UV (190-260 nm) Para los péptidos C-ter y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A

### 8.1.2 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para poder visualizar la morfología *in vitro* de las estructuras adoptadas por los fragmentos C-ter, N-ter y F<sub>23</sub>R, se utilizó la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés) Prime JEOL-7800F con detector de barrido (STEM) a 30.0 kV bajo una concentración de 6 µg/mL de péptido. Cabe señalar que en este análisis no se incluyó a la variante I<sub>26</sub>A debido al comportamiento atípico presentado por DC.

De forma importante, como un análisis control para comprobar la naturaleza y composición química de las muestras, se sometieron a un análisis químico cualitativo de superficie mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (XEDS) [74], el cual se fundamenta en la radiación emitida por los electrones a manera de fotones que está directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor. Gracias a este principio se pudo identificar y diferenciar aquellos elementos constitutivos presentes tanto en la solución buffer así como en la muestra del péptido C-ter. Derivado del presente análisis se encontró en la solución buffer la ausencia del elemento Nitrógeno en contraparte de una abundancia de los elementos K, O, Ni, I, Cu y Si (Figura 5 A), lo anterior sugiere la ausencia de materia orgánica. Por otra parte en la (Figura 5 B) se muestran los resultados del análisis del péptido C-ter, encontrándose una mayor prevalencia de los elementos C, O y N, indicativo de materia orgánica.

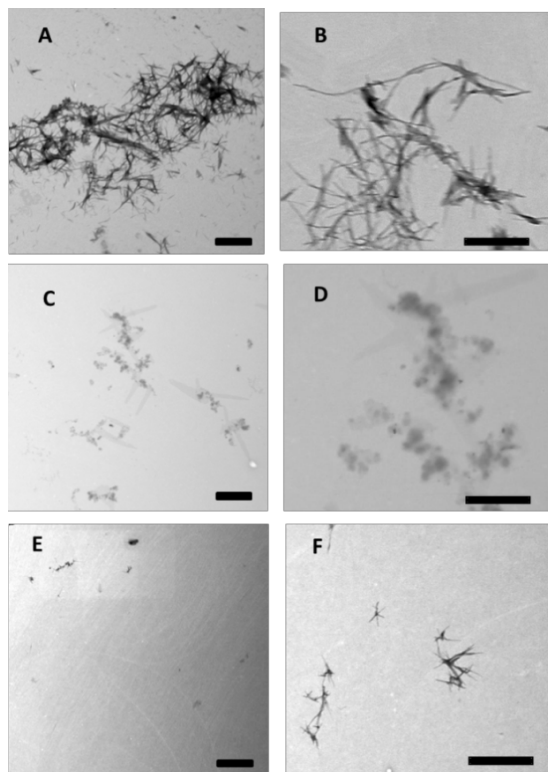


**Figura 5.** Análisis químico de superficie con espectrometría de dispersión de energía de rayos X [74]. En el eje de las ordenadas se presenta el número de cuentas (cps /eV) contra kiloelectronvolts (keV) en el eje de las X. Cada tabla muestra el porcentaje de los elementos identificados en cada muestra. (A) Buffer fosfatos 20mM pH 7.4 (B) Muestra del fragmento C-ter de IAPP.

Uno de los aspectos importantes en el estudio de los péptidos fue la determinación de su estructura, la cual es dependiente de factores como el pH, la concentración del péptido, la naturaleza del medio en el que se encuentran, así como de las propiedades fisicoquímicas en la secuencia de los aminoácidos que los conforman. Mediante estudios de resonancia magnética nuclear en fase sólida aplicados al análisis del péptido A $\beta$  presente en la enfermedad de Alzheimer, se ha determinado que la estabilidad de su estructura en láminas beta-antiparalelas se debe además de los puentes de hidrógeno, a la presencia de puentes salinos e interacciones polares débiles entre las cadenas laterales [75]. Esto sugiere que la estabilización del hIAPP puede estar determinada por este mismo tipo de fuerzas.

En el presente estudio se realizó el análisis comparativo entre los péptidos C-ter, N-ter y F23R mediante TEM, encontrándose que las muestras del fragmento C-Ter <sup>23</sup>(FGAILSSTNVGSNTY)<sup>37</sup> (Figuras 6 A, B), presentaron cúmulos de estructuras irregulares en forma de fibras sin un patrón definido, debido probablemente al fenómeno de agregación propiciado por las cargas electrostáticas y los puentes de hidrógeno entre la secuencia de aminoácidos que conforman al C-ter. Bajo las mismas condiciones se evaluó como control al dominio N-ter de la IAPP, <sup>1</sup>(KCNTATCATQRLANFLVHSS)<sup>20</sup> reportado como el fragmento con menor propensión a la formación de estructuras beta [72], el cual presentó un patrón muy diferente al observado con el C-ter, al revelar una menor tendencia a la agregación con una morfología no fibrilar (Figura 6 C y D). Estudios fisicoquímicos del fragmento N-ter revelan la presencia de puentes disulfuro entre los residuos 2 y 7 de cisteína que promueve las fuerzas de repulsión actuando como un potencial factor que disminuye la tendencia a la agregación [76], así como la estabilización en las estructuras.

Bajo las condiciones de trabajo utilizadas en el presente estudio, la carga neta de +1 del fragmento F23R posiblemente fue un factor determinante al mostrar una baja tendencia a la agregación, como lo mostraron los diferentes campos, en donde se encontraron escasos conglomerados con estructuras fibrilares, posiblemente debido a una menor interacción entre los péptidos, disminuyendo los factores que desencadenan la formación de estructuras fibrilares, como las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , el rearreglo en los puentes de hidrógeno, y las interacciones de apilamiento entre residuos de glutamina (Figura 6 E y F).



**Figura 6** | Imágenes representativas de fibras amiloides *in vitro* mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión TEM. Comparativo de la morfología que adoptan las fibras de los fragmentos C-Ter (A,B) N-ter (C,D) y F<sub>23</sub>R (E,F). Las barras en negro representan una distancia de 1µm (A,C y E) y 500 nm (B,D y F).

## 8.2 Efecto del ambiente lipídico en la estructura secundaria

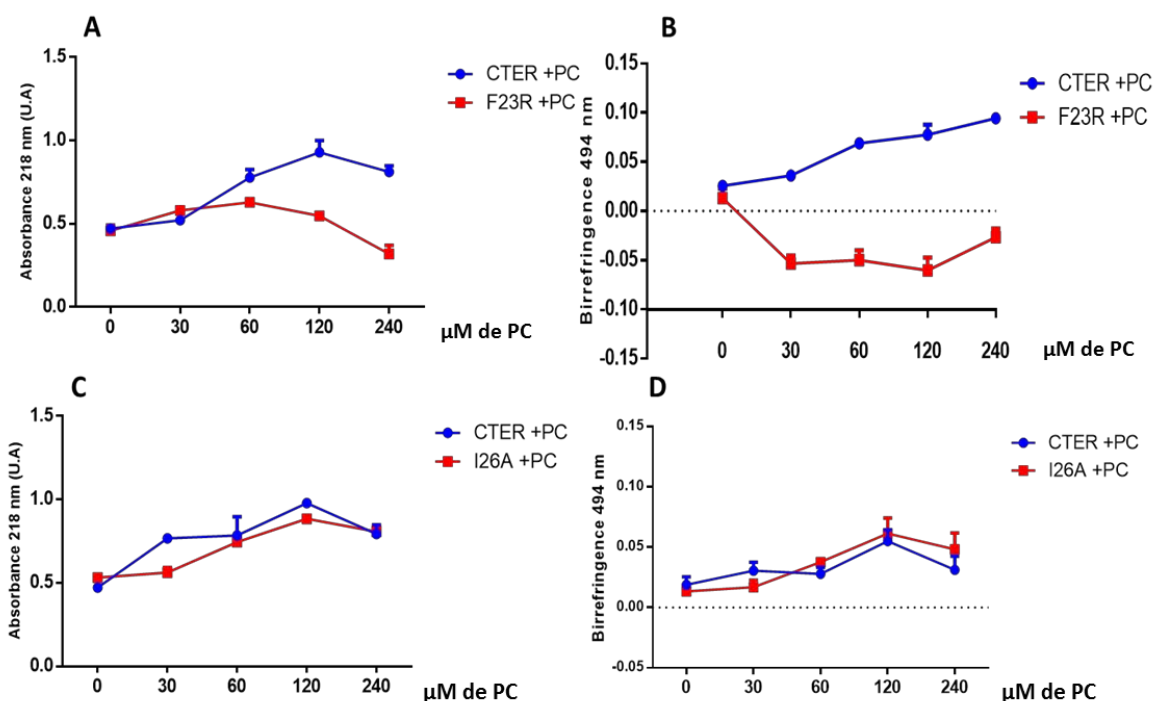
La caracterización de las variantes del fragmento C-ter de la IAPP se basó en el uso de herramientas bioquímicas que permitieran evaluar el efecto de la carga péptido-lípido a partir de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) conformadas primordialmente por PC y diferentes concentraciones de colesterol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol, respectivamente. Como parte primordial de este estudio, se evaluó el efecto de la fosfatidilserina, como un fosfolípido de naturaleza aniónica a un pH de 7.4 [77]. Lo que se ha reportado como un potencial inductor de cambios estructurales que condicionan la agregación de estructuras amiloides [18, 19, 78].

En un inicio se analizó a la fosfatidilcolina, descrito como un fosfolípido switteriónico, el más abundante en la membrana plasmática externa [79], el cual sirvió como base para la preparación de SUVs. El efecto de la fosfatidilcolina (PC) sobre el fragmento C-ter de la IAPP, así como sobre los fragmentos F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A se evaluó mediante el uso de estudios bioquímicos a través de espectroscopia del enlace peptídico a 218 nm y birrefringencia con rojo Congo (RC) a 494 nm [54] (Figura 8).

## 8.2.1 Modulación de la fosfatidilcolina por espectrofotometría a 218 nm y 494 nm con Rojo de Congo

Los péptidos se prepararon a 60  $\mu\text{g/ml}$ , de manera que bajo concentraciones crecientes de PC, se determinó que la variante F<sub>23</sub>R no tuvo un cambio significativo en su estructura, por lo que presentaron valores de absorbancia menores además de una notable separación en los valores de birrefringencia con rojo de Congo comparado al C-ter (figura 8A, B).

Bajo estas mismas condiciones se pudo apreciar que la variante I<sub>26</sub>A presentó una mayor tendencia a la formación de estructuras secundarias sobre todo a concentraciones por encima de 60  $\mu\text{M}$  de PC; contrario a lo esperado, su comportamiento fue muy semejante al C-ter debido probablemente a su semejanza en cuanto a parámetros fisicoquímicos como el punto isoeléctrico, valor de hidrofobicidad y la carga electrostática (Figura 8C y D). Para sustentar los resultados anteriores se realizó la evaluación por fluorescencia con tioflavina T.

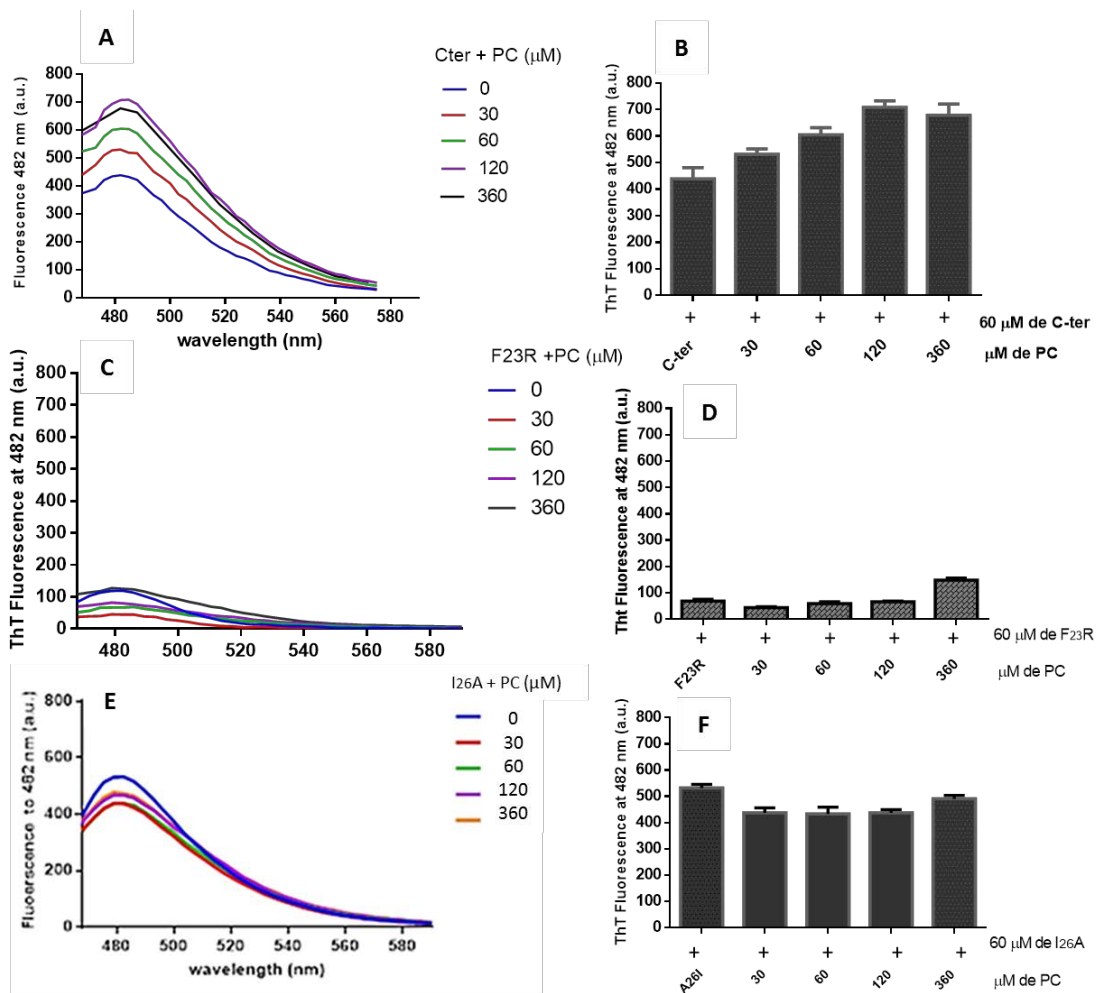


**Figura 8 | Caracterización del enlace peptídico mediante espectrofotometría a 218 y 494 nm con Rojo Congo. A.** Caracterización del C-ter y F<sub>23</sub>R con PC a 218 nm. **B.** Caracterización de C-ter y F<sub>23</sub>R con PC por Rojo Congo. **C.** Caracterización de Cter e I<sub>26</sub>A con PC a 218 nm **D.** Caracterización de C-ter e I<sub>26</sub>A con PC y Rojo Congo.

### **8.2.2 Modulación de PC sobre las variantes por fluorimetría con tioflavina T**

En un estudio realizado por Cho et al 2008 con liposomas de PC en estado zwitteriónico, se reveló que no presentaba un efecto significativo en la agregación sobre la IAPP. Tomando como antecedente dicho estudio, se evaluó si bajo concentraciones crecientes de PC en un estado zwitteriónico se presentaría un efecto significativo sobre cada una de las variantes. [80]

Considerando lo anterior, se encontró que a concentraciones mayores a 60  $\mu\text{M}$  de PC, la variante F<sub>23</sub>R no tuvo un efecto significativo hacia la generación de estructuras fibrilares (Figura 9 C, D), debido probablemente al carácter zwitteriónico de la PC, presentando los valores de emisión más bajos con respecto al fragmento C-ter (Figura 9 A, B), donde en este péptido fue evidente una modulación hacia la formación de estructuras beta dependiente de concentración. Por otra parte, la variante I<sub>26</sub>A presentó cambios estructurales que se mantuvieron estables en las concentraciones de 30, 60 y 120  $\mu\text{M}$  (Figura 9 E, F). Sin embargo los valores de fluorescencia fueron superiores con respecto a los reportados para F<sub>23</sub>R. De acuerdo a lo anterior, se puede considerar que no existe una modulación significativa sobre la variante F<sub>23</sub>R en un sistema zwitteriónico con PC.



**Figura 9** | Análisis de fluorescencia con tioflavina-T entre las variantes F23R e I26A y PC (A) Interacción de C-ter a diferentes concentraciones de vesículas con PC. (B) Representación de la señal emitida por ThT entre el C-ter y PC en gráfica de barras. C. Interacción entre F23R bajo concentraciones crecientes de PC. (D) Señal emitida por ThT entre F23R y PC en un gráfico de barras. (E) Emisión de ThT al interaccionar I26A bajo concentraciones crecientes de PC. (F) Representación en gráfico de barras de la señal emitida por ThT al interaccionar I26A con PC.

### 8.3 Modulación del colesterol sobre las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A por espectrofotometría a 218 nm y 494 nm

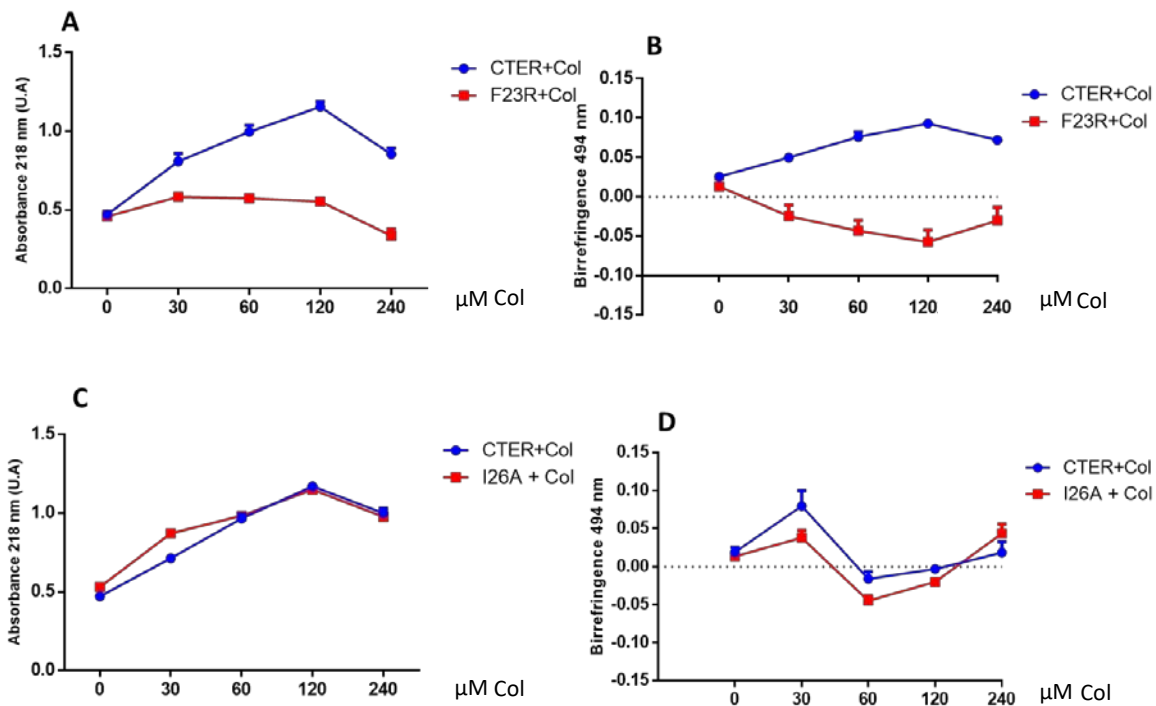
Para continuar con la modulación péptido-lípido se evaluó el efecto del colesterol y la PC con las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A. Cabe señalar que el colesterol ha sido descrito como un regulador de la fluidez de las membranas. Se encuentra en las balsas lipídicas, así como en una gran cantidad de membranas en donde establece un sitio para el andamiaje de varios complejos proteína-lípido, además de su importancia en la señalización celular.

Así mismo, el colesterol podría actuar como un regulador entre la interacción lípido-IAPP [78, 81].

Diversos estudios han encontrado que el colesterol actúa como un modulador en la agregación del fragmento hIAPP<sub>1-19</sub>, ya que la ausencia de colesterol provoca un mayor desorden en la bicapa interna promoviendo la formación de pentámeros similares a poros, mientras que en presencia de moléculas de colesterol, la bicapa lipídica se vuelve más ordenada y rígida, de manera que algunos estudios sugieren que los agregados de hIAPP<sub>1-19</sub> se podrían situar en la interface de la bicapa lipídica-agua [82].

Junto con lo anterior se han sumado otros estudios fisicoquímicos y de cinética de agregación de proteínas [78] mediante los cuales se ha determinado que la asociación entre fosfolípidos y el colesterol en las membranas podrían modular la agregación de la IAPP al cambiar la energía de activación y conducir a la transición de IAPP de un estado desordenado al de láminas- $\beta$ , lo cual indica que los lípidos aniónicos y el colesterol no cambian el mecanismo de agregación de IAPP, pero pueden actuar catalizándolo o inhibiéndolo, respectivamente. Con base en lo anterior se prepararon vesículas unilamelares de PC:colesterol bajo una relación molar (3:2) para evaluar su efecto sobre las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A.

Como resultado de este estudio, se encontró que el colesterol no promovió cambios estructurales en la variante F<sub>23</sub>R (Figura 10 A, B), en los cuales se pudo apreciar que, a pesar del aumento en la concentración de las vesículas lipídicas formadas por colesterol no se indujo un cambio que aumentará la tendencia a la agregación. Bajo este sistema, el colesterol no ejerció la formación de interacciones hidrofóbicas sobre la variante F<sub>23</sub>R que condujeran a la formación de láminas beta. Mientras que la variante I<sub>26</sub>A presentó una fuerte modulación hacia la formación de estructuras laminares beta, presentando incluso valores de absorbancia y birrefringencia muy semejantes a los obtenidos con el C-ter de la IAPP. Con base en lo anterior se observó en el análisis a 218 nm que, a concentraciones por encima de 60  $\mu$ M de colesterol se presentó un traslape entre ambas curvas y en el análisis a 494 nm hubo un aumento considerable de la birrefringencia a las concentraciones de 30 y 240  $\mu$ M, lo cual refleja que dicha variante es susceptible a presentar una fuerte atracción electrostática que podría provocar un cambio conformacional en su estructura secundaria (Figura 10 C y D).



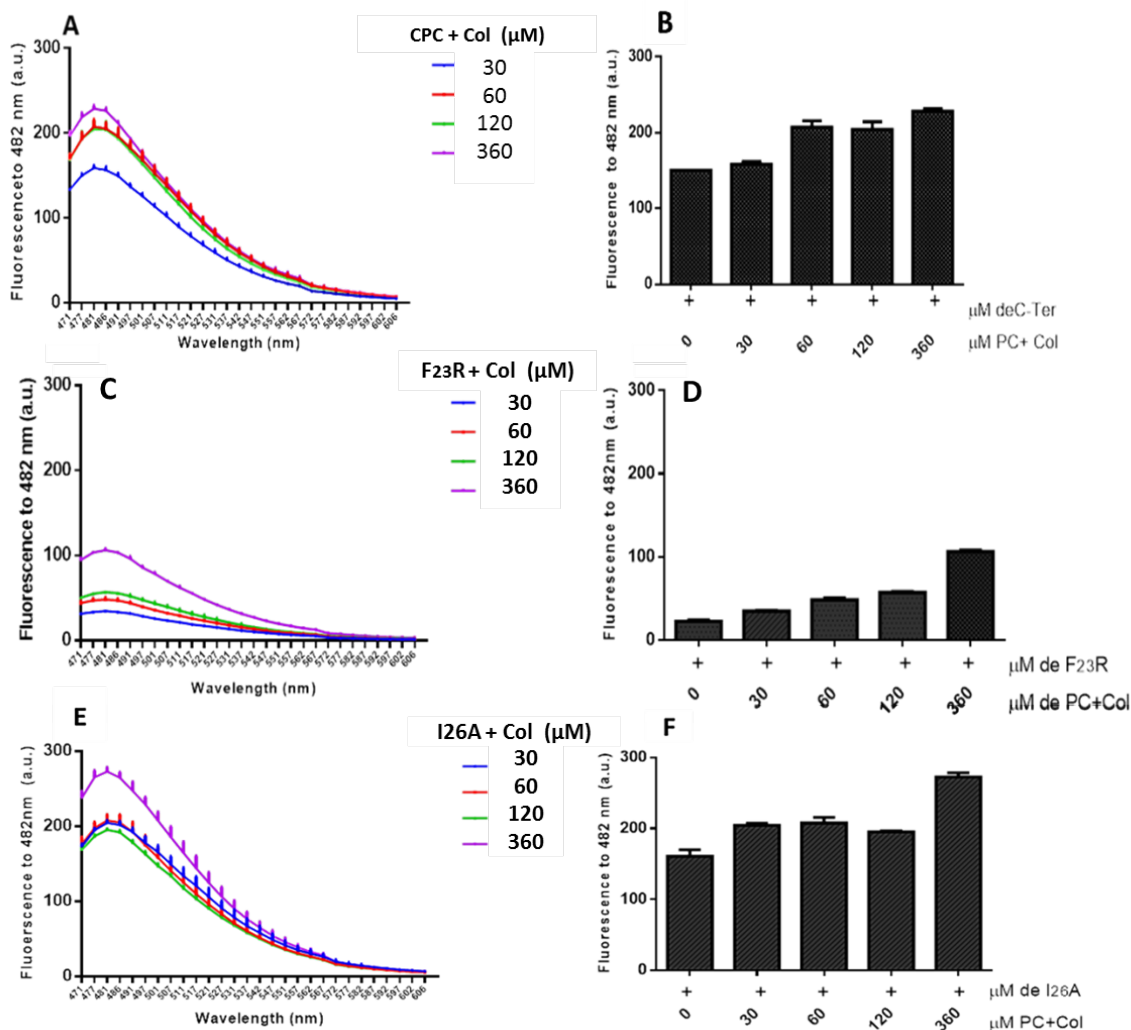
**Figura 10** | Caracterización del C-ter, F23R e I26A bajo la incubación de SUVs compuestas de PC + Colesterol por espectrofotometría a 218 nm y el cambio de birrefringencia con rojo de Congo a 494 nm. (A) Efecto bajo concentraciones crecientes de vesículas de PC+ Colesterol bajo la incubación con C-ter y F23R. (B) Cambio en la birrefringencia provocado por la interacción entre vesículas de PC+Colesterol con Cter y F23R con rojo de Congo (C) Efecto en la absorbancia por la interacción entre PC+Colesterol con I26A. (D) Cambio en la birrefringencia por la interacción entre vesículas de PC+ Colesterol con I26A.

### 8.3.1 Modulación de colesterol sobre las variantes por fluorometría

Para corroborar el fenómeno observado en los estudios por espectrofotometría del enlace peptídico a 218 nm y la birrefringencia a 494 nm con rojo de Congo y comprobar la presencia de estructuras de tipo laminar, se realizó el análisis por fluorometría con tioflavina-T. Para el fragmento C-ter se determinó una tendencia a la formación de estructuras beta laminares dependiente de la concentración de colesterol (Figura 11 A, B). Por otra parte, se comprobó que a concentraciones por debajo de 360  $\mu\text{M}$  de colesterol la variante F<sub>23</sub>R mantuvo los valores de fluorescencia más bajos, lo cual indica que no existió una modulación que condujera a un cambio estructural hacia láminas-beta, (Figura 11 C, D).

En contraste a lo que se esperaba, los valores de fluorescencia obtenidos para la variante I<sub>26</sub>A se elevaron, incluso a la concentración más baja de 30  $\mu\text{M}$ , manteniéndose sin

cambios significativos a las concentraciones de 60 y 120  $\mu\text{M}$ , para luego a 360  $\mu\text{M}$  aumentar por encima de los obtenidos por el control C-ter de la IAPP. Los parámetros como el punto isoeléctrico, el momento hidrofóbico e hidropatía presentados por la variante I<sub>26</sub>A pueden ser factores que influyen y propician una mayor interacción entre el péptido, lo cual no pudo contrarrestar la presencia del colesterol (Figura 11 E, F)



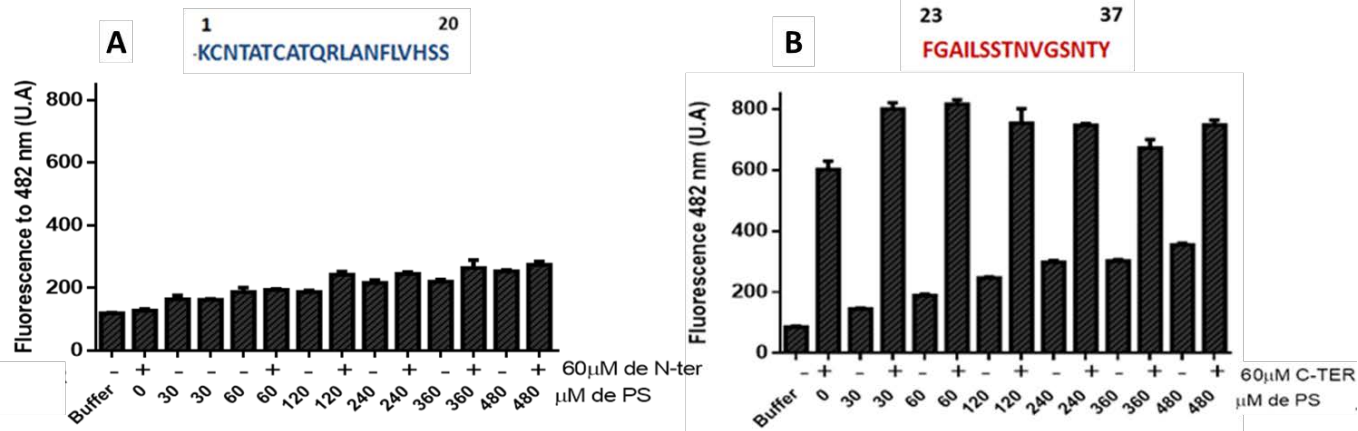
**Figura. 11** | Análisis de fluorescencia con tioflavina T entre las variantes F23R e I26A sobre SUVs compuestas de PC+ Colesterol. (A) Interacción de C-ter a diferentes concentraciones de vesículas con PC+Colesterol. (B) Representación de la señal emitida por Th-T entre C-ter y PC en gráfica de barras. (C) Interacción entre F23R bajo concentraciones crecientes de PC+Colesterol. (D) Señal emitida por ThT entre F23R y PC + Colesterol en un gráfico de barras. (E) Emisión de ThT al interactuar I26A bajo concentraciones crecientes de PC+ Colesterol. (F) Representación en gráfico de barras de la señal emitida por Th-T al interactuar I26A con PC+ Colesterol.

#### 8.4 Modulación de PS sobre los dominios Carboxilo y amino de IAPP

Dado que la IAPP es un péptido que en su estado nativo presenta una carga positiva +3, se podría esperar que en un sistema aniónico como el de la PS pueda promover su agregación y a su vez, conducir a la formación de estructuras fibrilares altamente citotóxicas [17, 83]. El análisis *in silico* de hidrofobicidad mostró que la variante F<sub>23</sub>R posee una carga neta de +1 mientras que para I<sub>26</sub>A la carga neta fue de 0. Estudios bioquímicos han reportado que liposomas formados por PS aumentan la tasa de agregación de la IAPP, lo que sugiere una fuerte interacción electrostática y la consecuente inducción de cambios conformacionales [18, 19]. Los sistemas aniónicos como la PS y el fosfatidilglicerol (POPG) proporcionan una base importante para evaluar los cambios estructurales sobre las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A, la cual se realizó bajo una relación 1:2 péptido-lípido (60  $\mu$ M pH 7.4), incubándose a 37°C durante 12 h (Figura 12).

En una primer serie experimental, mediante la técnica de fluorimetría con ThT se analizó al IAPP por separado en los dos dominios C-ter y N-ter a una concentración de (60  $\mu$ M) bajo concentraciones crecientes de PS. Como resultado se obtuvo que para el extremo N-ter de IAPP hubo una menor interacción con PS, con lecturas de emisión de fluorescencia mínimos (Figura 12A). Debido a que el fragmento comprendido entre los residuos 1 al 17 presenta un mayor número de cargas positivas, no se ha asociado a la formación de estructuras beta laminares, esto debido a las restricciones conformacionales asociadas con el puente disulfuro entre los residuos 2 y 7 del extremo N-ter. Así mismo, se ha estudiado que a pH bajos, el residuo H<sub>18</sub> juega un papel importante al protonarse y evitar la interacción entre la membrana y el péptido, disminuyendo la propensión a la agregación. [84, 85]

En contraste, los residuos del 17 al 29 es donde se ha presentado una mayor interacción con membranas aniónicas como sucedió con el fragmento C-Ter, al ser identificado como el núcleo más amiloidogénico de la hIAPP y en presencia de PS, debido a una mayor interacción péptido-lípido produciendo un aumento en las estructuras secundarias- $\beta$  desde concentraciones bajas (30  $\mu$ M), manteniendo ese mismo comportamiento a concentraciones altas de PS (Figura 12B).



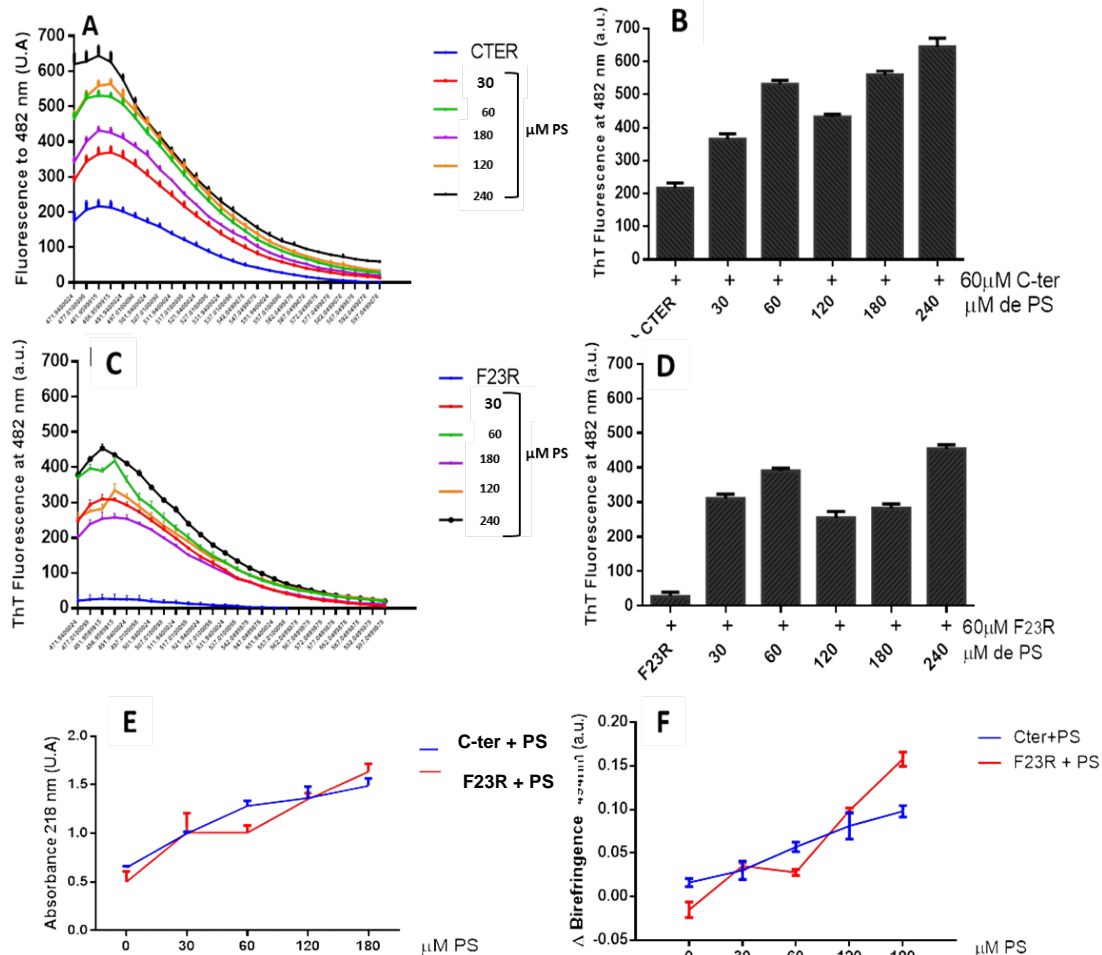
**Figura 12** | Caracterización de los extremos N-ter y C-ter de la amilina por efecto de la PS mediante la técnica de fluorescencia asociada a tioflavina T (ThT). (A) Muestra el cambio de la fluorescencia con respecto al aumento en la concentración de la PS sobre el fragmento N-TER. (B) Cambio en la fluorescencia con respecto de la concentración de PS bajo una concentración constante del fragmento C-TER.

#### 8.4.1 Modulación de PS sobre variantes por fluorescencia con tioflavina-T

Las variantes se evaluaron bajo concentraciones crecientes de PS debido a que se ha observado una acelerada formación de agregados de IAPP en membranas formadas por lípidos aniónicos, valoradas por técnicas de difracción circular, así como por espectrometría de fluorescencia [18].

Los resultados obtenidos mostraron una notoria modulación de la PS sobre los péptidos C-ter (Figura 13 A y B), donde se aprecia un significativo aumento en los valores de fluorescencia dependientes de la concentración de PS. Por otra parte, la variante F<sub>23</sub>R presentó una considerable formación de estructuras-beta como se muestra en la Figura 13 C, incluso a la concentración más baja de 30 μM. Este comportamiento contrasta con lo observado con PC y PC/Colesterol, donde la variante F<sub>23</sub>R permanecía sin alteraciones significativas en su estructura. Algo muy similar se obtuvo en un estudio paralelo al caracterizar a F<sub>23</sub>R por espectrofotometría a 218nm y rojo Congo a 494 nm (Figuras 13 E y F), presentando un notable aumento en los valores de absorbancia y birrefringencia, sobre todo bajo las concentraciones de 120 y 180 μM, dichos resultados confirman la alta propensión de la variante F<sub>23</sub>R a presentar cambios conformacionales debidos al factor carga electrostática negativa de la PS.

Así mismo fue de gran importancia la caracterización de las variantes bajo un sistema aniónico en el cual se determinó el efecto de la carga sobre la estructura secundaria de dichos péptidos, mediante el uso de técnicas como espectroscopía a 218 nm y rojo Congo, las cuales han sido un referente para detectar estructuras beta amiloides.



**Figura 13** | Análisis de Fluorescencia con tioflavina T entre las variantes  $F_{23}R$  y PS. (A) Interacción de C-ter a diferentes concentraciones de de PS. (B) Representación de la señal emitida por ThT entre C-ter y PC en gráfica de barras. (C) Interacción entre  $F_{23}R$  bajo concentraciones crecientes de PS. (D) Señal emitida por Tht entre  $F_{23}R$  y PS en un gráfico de barras. (E) Lecturas de absorbancia a 218 nm entre  $F_{23}R$  y concentraciones crecientes de PS. (F) Cambio en la birrefringencia por espectrometría con Rojo congo entre  $F_{23}R$  y concentraciones crecientes de PS.

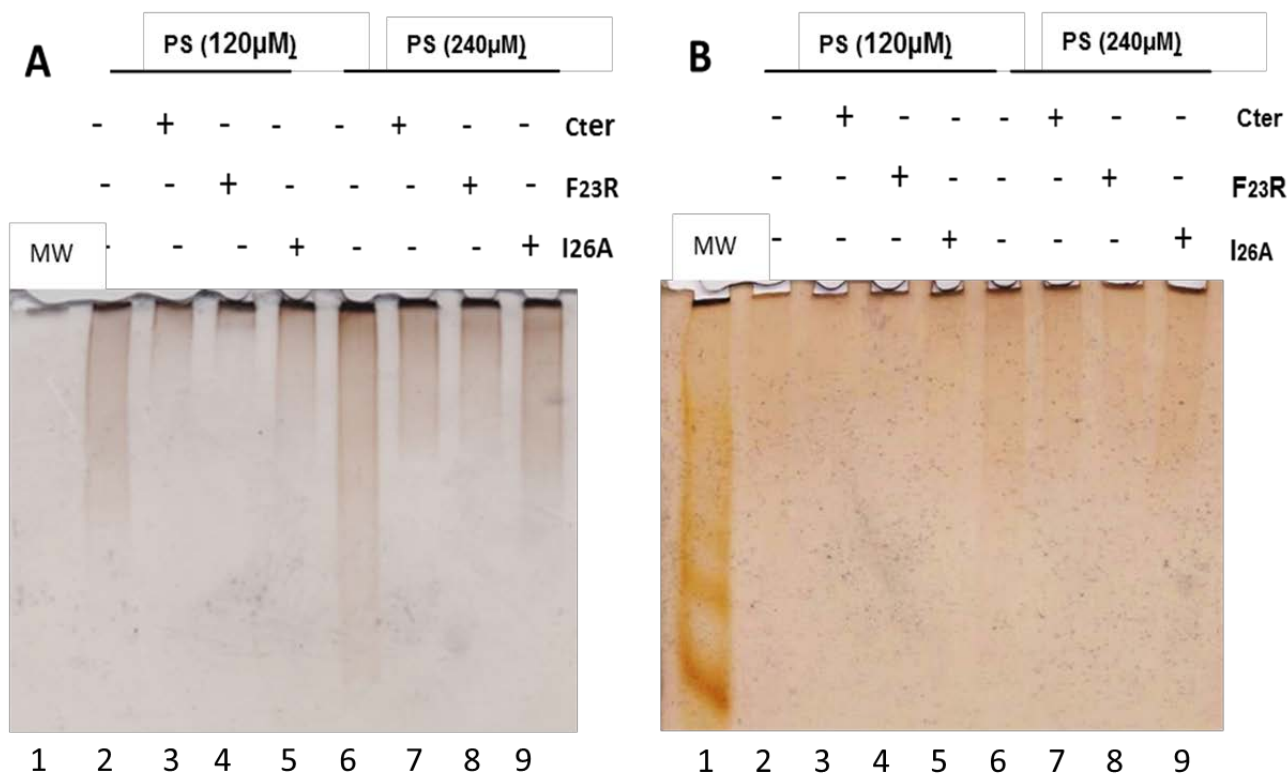
#### 8.4.2 Caracterización con PAGE de gradiente

El uso de geles de poliacrilamida de gradiente no desnaturizante (1-15%) teñidos con negro de Sudán y nitrato de plata permitió evaluar la interacción péptido-lípido, encontrando una mejor resolución a las concentraciones de 120 y 240  $\mu\text{M}$  de PS. Como se indicó anteriormente, bajo condiciones fisiológicas la hIAPP presenta una carga positiva +3, sin embargo al estudiar su comportamiento en fragmentos peptídicos, su carga neta es distinta. Por ejemplo en el caso de C-ter e I<sub>26</sub>A presentan una carga neta (0), mientras que F<sub>23</sub>R presenta una carga neta de +1. Eso representa un factor importante en la evaluación con los geles.

Para evidenciar su comportamiento se emplearon dos tinciones, la de negro de Sudán con una gran afinidad por estructuras de naturaleza lipídica y la de nitrato de plata con una mayor afinidad por estructuras de naturaleza peptídica. Los resultados de la electroforesis revelaron una evidente interacción péptido- lípido sobre C-ter y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A (Figura 14 A y B).

Un acortamiento en el barrido de los carriles 4 y 8 de la (Figura 14 A-B) correspondiente a la variante F<sub>23</sub>R demostró cómo un ambiente aniónico producto de la carga de la PS y la carga +1 de F<sub>23</sub>R influye notoriamente en la formación de estructuras beta amiloides con un mayor peso molecular que retardan el avance de dichos péptidos. Este mismo comportamiento se presentó con C-ter y la variante I<sub>26</sub>A carriles 5 y 9 de la (Figura 14 A-B) sin embargo el acortamiento no fue tan pronunciado debido posiblemente a una menor formación de estructuras beta.

Con base en lo anterior se pudo notar que existe un comportamiento muy particular entre la variante F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A bajo sistemas aniónicos como el de la PS donde los valores predictivos encontrados por Aggrescan (Na4vSS) para F<sub>23</sub>R (-5.3) e I<sub>26</sub>A (-8.20) podrán favorecer a la segunda variante I<sub>26</sub>A, sin embargo en el contexto general de los análisis realizados esto no es definitivo.



**Figura 14** | Electroforesis de gradiente de poliacrilamida (1 - 15%) bajo una relación molar péptido- lípido 1:2 y 1:4. (A) Efecto de PS sobre las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A teñidos con Negro de Sudán. (B) Interacción péptido- lípido con tinción Nitrato de plata del mismo experimento. Se respetó el mismo orden de carga en ambos geles, solo cambia la tinción

### 8.4.3 Nucleación de las variantes con respecto al tiempo

La amiloidogénesis es un proceso que comienza con una fase de retraso conocida como fase de latencia o lag en la que no se observa agregación con técnicas de microscopía, durante este tiempo se produce el proceso de asociación inicial, desfavorable en términos de entropía. Una vez que comienza el proceso de agregación y se forma un núcleo crítico, la agregación procede rápidamente en fibrillas de tipo amiloide [86]. Durante este tiempo se lleva a cabo el proceso de asociación inicial en la cual las estructuras oligoméricas del hIAPP comienzan a establecer uniones electrostáticas entre sí para pasar a estructuras mucho más ordenadas y de mayor peso molecular, un proceso dependiente de la concentración del péptido [73].

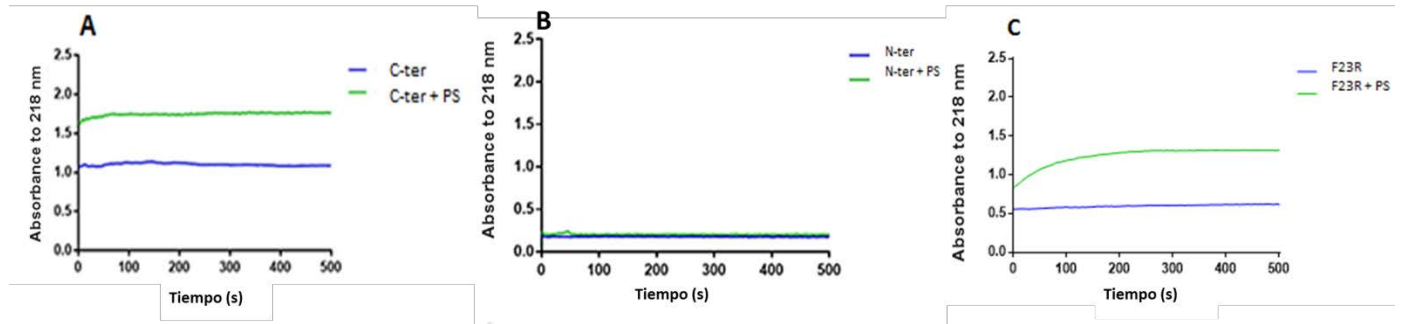
Dado que hIAPP tiene varios residuos con carga positiva, la mayoría de los cuales se encuentran en el dominio N-terminal del péptido, se ha propuesto que esta región

podría estar implicada en la interacción inicial de hIAPP con lípidos de carga negativa. De hecho, se ha demostrado que la unión a membrana de hIAPP es más eficaz cuando los lípidos de la bicapa están cargados negativamente [83]. De acuerdo a lo anterior, estudios de agregación o nucleación proteica de monómeros a fibras maduras establecen que siguen una curva de tipo sigmoidal [87, 88].

El mecanismo molecular de la agregación de proteínas todavía no está bien definido debido a que la fibrilación es un proceso altamente dinámico y heterogéneo. Muchos de los péptidos y las proteínas que están involucradas en las enfermedades mal plegadas más comunes como el caso de la hIAPP, son intrínsecamente desordenados en sus formas monoméricas. Este proceso es controlado cinéticamente por varios factores como la presencia de iones metálicos, así como interacciones entre otras proteínas y lípidos de membrana [89].

Para realizar una aproximación al fenómeno de nucleación-agregación a fibras amiloides se sometió al fragmento C-ter, N-ter y F<sub>23</sub>R a un estudio en el cual se evaluó el cambio en la absorbancia del enlace peptídico con respecto al tiempo mediado por la PS, las condiciones experimentales fueron (60 μM/120 μM) péptido/lípido, en un tiempo de 500 s, utilizando espectrometría a 218 nm. Bajo las condiciones anteriormente descritas, se obtuvo que el fragmento C-ter por efecto de la PS (Figura 15 A) presentó un incremento en los valores de absorbancia debido al cambio en su estructura produciendo un desplazamiento de la curva hacia arriba con respecto al control C-ter y un acortamiento de la fase lag.

Por otra parte es importante mencionar que no existió una modulación de la PS sobre el fragmento N-ter a pesar de la carga electrostática positiva presente en su estructura, lo que puede explicarse por la presencia del puente disulfuro presente entre los residuos 2 y 7 que podrá evitar el ordenamiento e inhibe el proceso de nucleación, lo cual puede apreciarse en la (Figura 15 B) donde ambas curvas se encontraron solapadas al no presentar un cambio conformacional en su estructura. En el caso de la variante F<sub>23</sub>R (Figura 15 C) presentó una curva de tipo hiperbólica como resultado de la interacción con la PS, acortando la fase lag e incrementando los valores de absorbancia como consecuencia de cambios estructurales y una rápida interacción péptido-lípido.



**Figura 15** | Prueba de nucleación de péptidos con respecto a tiempo mediante espectrometría a 218 nm (A) Efecto de la fosfatidilserina sobre C-ter (B) Efecto de la fosfatidilserina sobre N-Ter. C. Efecto de la fosfatidilserina sobre F23R.

#### 8.4.4 Prueba de viabilidad celular de fosfatidilserina con las variantes de la IAPP

Hasta ahora la caracterización de las variantes *in vitro* ha revelado una alta propensión a generar cambios estructurales en sistemas aniónicos, por tal motivo fue de gran interés evaluar su comportamiento en un modelo celular que mimetizará las condiciones celulares en las que podrían encontrarse estos péptidos. Estudios a nivel molecular destacan que las membranas de las células  $\beta$  están conformadas de entre un 2.5 y un 13.2 % mol de lípidos aniónicos así como de balsas lipídicas formadas por colesterol y esfingomielina [83].

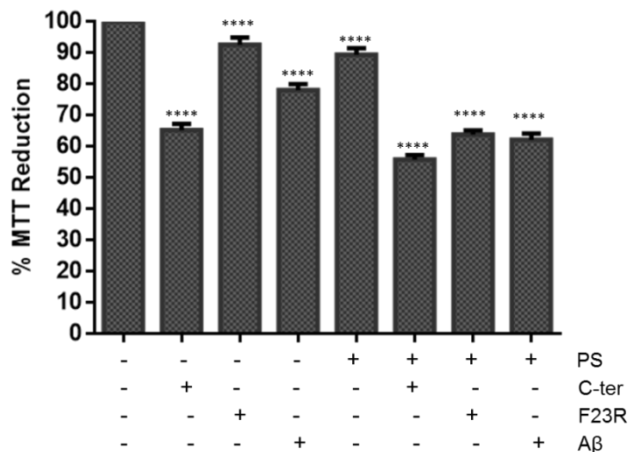
Para ello se realizaron estudios de viabilidad midiendo la actividad metabólica celular mediante la técnica de MTT, un compuesto perteneciente a las sales de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) que al reducirse en ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano). Por acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células en estudio, genera un compuesto color violeta de la familia de los formazanos insoluble en agua, el cual puede ser cuantificado por espectroscopía a 570 nm. Esto quiere decir que un aumento en la reducción de MTT refleja una mayor viabilidad celular.

En este estudio se empleó un modelo de células beta de Langerhans (RIN-m5f) que producen insulina de forma nativa, donde se evaluó el efecto de la PS sobre las

variantes para comprobar si los cambios conformacionales inducidos por el efecto de la carga de la PS producirían un efecto citotóxico.

A su vez se eligió al péptido A $\beta$  como control al tener una fuerte interacción con lípidos de la membrana, descrito por ser el principal componente de los depósitos amiloides en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer; lo anterior con el objeto de comprobar si un ambiente aniónico podría influir en su agregación [90].

Se trabajó bajo una relación 1:2 péptido/lípido (7.5  $\mu$ M y 15  $\mu$ M) respectivamente. Los resultados revelaron que la variante F<sub>23</sub>R en presencia de PS presentó un efecto deletéreo sobre las membranas de las células RIN disminuyendo considerablemente su viabilidad con respecto al control de F<sub>23</sub>R, donde se aprecia una baja citotoxicidad. Por su parte el fragmento C-ter y el péptido A $\beta$  como había sido reportado tuvieron un comportamiento de agregación y toxicidad similar al IAPP [91, 92], esto revela que bajo la incubación con un sistema aniónico como el de la PS, la variante F<sub>23</sub>R y los péptidos C-ter y A $\beta$  son susceptibles a presentar cambios conformacionales que aumentan su citotoxicidad en cultivos celulares (Figura 16)



**Figura 16** | Viabilidad celular evaluada por la prueba de MTT en células RIN-m5f bajo el estímulo de los péptidos F<sub>23</sub>R, C-ter y A $\beta$  mediante vesículas de PS con una relación 1:2, (7.5  $\mu$ M péptido + 15  $\mu$ M de lípido respectivamente) Los valores de la media fueron los siguientes, (n = 6, X  $\pm$  SD), \*\*\*\*p < 0.005)

#### 8.4.5 Estímulo y expresión de proteínas en células RIN m5F

Los estímulos externos debido a una alta concentración de ácidos grasos como el palmítico y oleico pueden activar mecanismos intracelulares relacionados con el estrés de retículo y expresión de proteínas que son clave en la homeostasis celular [5].

Por tal motivo es de gran interés investigar los mecanismos de expresión de proteínas implicadas en los procesos de agregación de IAPP y sus variantes. Numerosos estudios han confirmado que la exposición a altas concentraciones de IAPP induce defectos en la secreción de insulina debido a su capacidad de agregarse y formar oligómeros intracelulares [93, 94]. Se ha demostrado que altas concentraciones de hIAPP podrían inhibir la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje CCVD, lo que conduce a un defecto en la movilización de  $Ca^{+2}$  intracelular en los islotes pancreáticos [95].

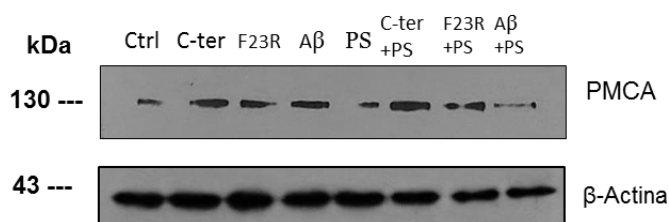
Por otra parte se ha encontrado que las fibrillas de hIAPP maduras no son citotóxicas *in vitro*; sin embargo la transición de las estructuras alfa helicoidales a láminas  $\beta$ , junto con la agregación de *nov*, fue la responsable de inducir la muerte celular en cultivos de células  $\beta$ . Este fenómeno de agregación puede suceder a nivel intra y extracelular y de esta manera afectar en la viabilidad celular [96].

Para evaluar el efecto intracelular provocado por los estímulos con los respectivos péptidos y la PS se realizó el análisis de la expresión de proteínas mediante la técnica de western blot. De lo anterior se encontró una activación generalizada en la expresión de la bomba de calcio de la membrana plasmática o PMCA de 130 kDa (Figura 16).

Recordando que las células RIN-m5F son células secretoras de insulina dependientes de calcio, se podría esperar que el estímulo con los diferentes péptidos podría influir en una disminución en el flujo de calcio mediado por PMCA. De todos los estímulos, la preparación de PS con el péptido A $\beta$  presentó una disminución en la expresión de PMCA, lo cual sugiere que esta condición pudiera conducir a la muerte celular. Mientras que la preparación de la variante F<sub>23</sub>R con PS tuvo solo una ligera disminución en la expresión de PMCA, en el caso del estímulo de C-ter con PS se presentó un aumento en la expresión de PMCA.

De todo lo anterior se deduce, que a pesar de la presencia de los estímulos de PS con los péptidos, las células mantuvieron su actividad metabólica sin una aparente

disminución en el intercambio de calcio intracelular, esto podría constatarse cuantificando insulina en el medio extracelular.



**Figura 17** | Expresión de PMCA y  $\beta$ -actina (control de carga) en células RIN m5f mediante Western blot.

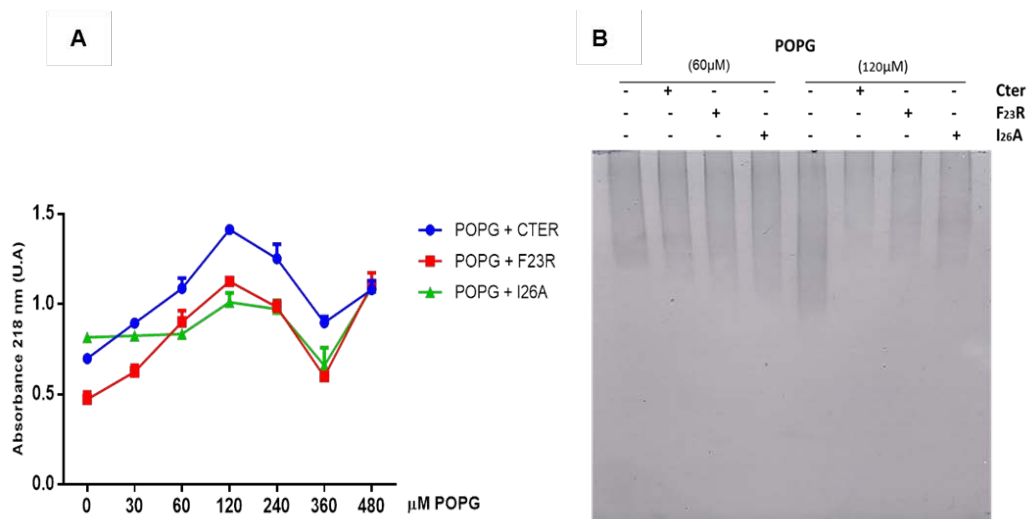
## 8.5 Caracterización de variantes con fosfatidilglicerol (POPG)

Para corroborar los resultados anteriores y confirmar de manera experimental si el ambiente aniónico de la PS es el factor crítico que conduce a la formación de estructuras beta, se eligió a POPG como un sistema alternativo a la fosfatidilserina, el cual pertenece a los fosfolípidos de membrana con carga negativa [97]. Teniendo como antecedente estudios de dinámica molecular del monómero de IAPP, se encontró que de manera análoga a la PS, el carácter aniónico del 1 palmitoil-2oleil-sn-glicero-3 fosfo-(1'-rac-glicerol) o POPG pudo favorecer cambios estructurales sobre dicho péptido modulando la estructura hacia la formación de fibras [85].

Para ello se prepararon vesículas de PC con POPG en una relación 3:1, manteniendo constante la concentración de los péptidos. Los resultados por espectrometría del enlace peptídico a 218 nm, mostraron un comportamiento muy similar al presentado con la PS. En este caso, el incremento de la absorbancia se observó a concentraciones mayores a 30  $\mu$ M de POPG, tanto para F<sub>23</sub>R como para I<sub>26</sub>A, los cuales presentaron cambios estructurales específicamente a las concentraciones de 60  $\mu$ M y 120  $\mu$ M, lo cual demuestra una modulación dependiente de la concentración de POPG, donde el factor carga negativa favorece las interacciones hidrofóbicas no covalentes, entre las cadenas laterales de las variantes (Figura 18 A).

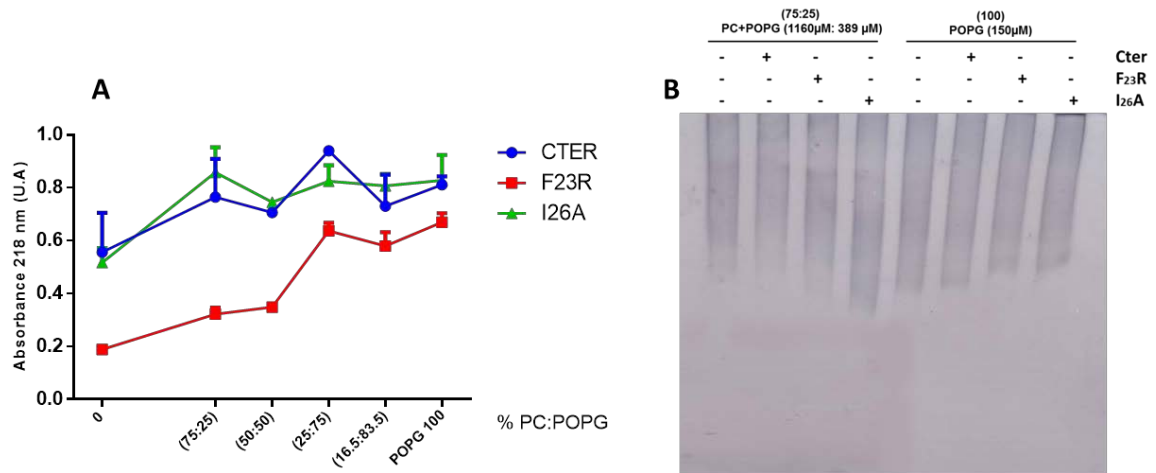
Para observar el efecto encontrado en el análisis por espectrometría a 218, se utilizaron geles de gradiente de poliacríamida con negro de Sudán (Figura 18 B), eligiéndose las concentraciones de 60 y 120  $\mu$ M de POPG mediante las cuales se presentó un evidente

acortamiento en los barridos, específicamente en C-ter. Este fenómeno posiblemente está relacionado con la formación de estructuras secundarias de mayor peso molecular, siendo mucho más evidente a la concentración de 120  $\mu\text{M}$ .



**Figura 18** | Caracterización de variantes con fosfatidil glicerol POPG por espectrometría a 218 nm. (A) Efecto de POPG con C-ter, F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A. (B) PAGE de gradiente 1-15% tinción negro de Sudán evaluación del comportamiento de las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A a 60 y 120  $\mu\text{M}$

Tomando como precedente el resultado anterior y para visualizar mejor la interacción péptido-lípido se decidió ampliar el panel de concentraciones de PC- POPG basándonos en la concentración de 60  $\mu\text{M}$  la cual corresponde a la relación 1:2 péptido-lípido donde observamos la transición estructural de los péptidos, (Figura 18 A), decidimos evaluar de una manera más precisa la concentración crítica a la cual se presentaban dichos cambios. Para evaluar el fenómeno de la concentración-carga se prepararon SUVs bajo diferente relación de PC:POPG (Figura 19 A). Los cambios en la absorbancia 218 nm fueron muy evidentes desde las concentraciones más bajas confirmaron que el ambiente aniónico de POPG sobre la variante I<sub>26</sub>A propició cambios estructurales a partir de la relación 75:25, al presentar un comportamiento muy semejante a C-ter, por su parte la variante F<sub>23</sub>R también presentó cambios estructurales, a partir de la relación 25:75.



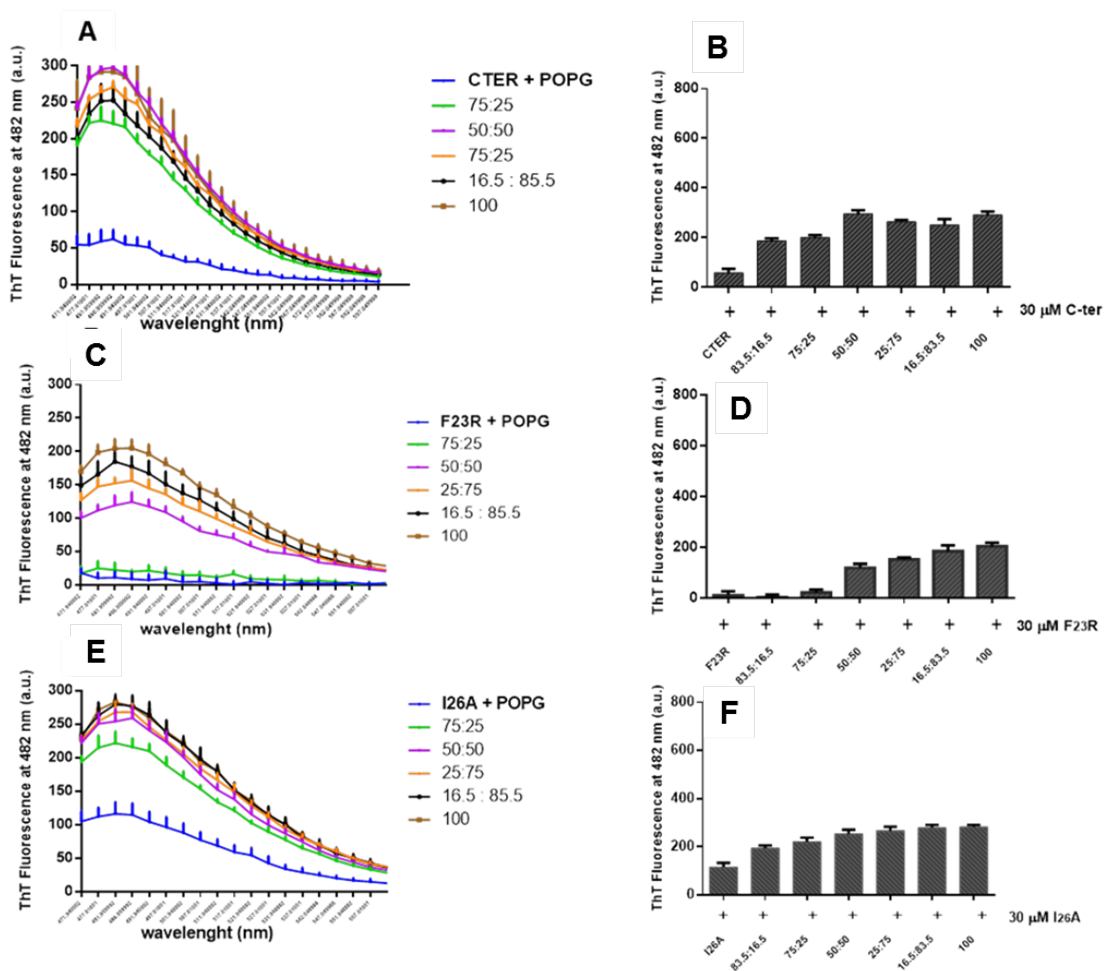
**Figura 19** | Caracterización de péptidos de POPG por espectrometría a 218 nm. (A) Efecto bajo diferentes concentraciones de POPG sobre C-ter, F<sub>23</sub>R, I<sub>26</sub>A. (B) PAGE de gradiente 1%-15% tinción negro de Sudán, análisis del comportamiento de las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A a 60 y 120 µM.

Para constatar el efecto de POPG observado en la espectroscopía sobre las variantes, se realizaron los respectivos geles de gradiente de poliacrilamida con tinción de Negro de Sudán (Figura 19 B), seleccionándose las condiciones (25:75 PC:POPG y 0:100 PC:POPG), mediante las cuales se pudo observar tanto en I<sub>26</sub>A como en F<sub>23</sub>R un mayor acortamiento en el barrido del lípido con respecto al control de POPG, debido a una posible formación de estructuras amiloides de mayor peso molecular.

### 8.5.1 Caracterización de POPG por fluorescencia con tioflavina T

La interacción entre POPG con péptidos, ha sido evaluada anteriormente mediante dinámica molecular, estos estudios revelaron que las fuerzas electrostáticas de Van Der Waals, juegan un papel predominante para propiciar la interacción péptido-membrana en función del pH. A su vez, se ha demostrado que los puentes de hidrógeno establecen interacciones entre las cabezas de fosfolípidos, específicamente entre los grupos éster de POPG con los residuos N<sub>31</sub>, S<sub>34</sub>, N<sub>35</sub> e Y<sub>37</sub> de la IAPP [98]. Para evaluar los cambios estructurales influenciados por el sistema aniónico de POPG sobre las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A se realizó la caracterización por fluorescencia con tioflavina T, bajo la relación 1:2 péptido-lípido. Los resultados mostraron una fuerte modulación de POPG sobre el C-Ter a partir de la relación 75:25, incrementando considerablemente los valores de fluorescencia (Figura 20 A). Como puede verse en el gráfico de barras, la presencia de

estructuras beta por acción de PPOG mantuvo una señal de fluorescencia elevada (Figura 20B). Por su parte, la variante F<sub>23</sub>R mantuvo los valores de fluorescencia más bajos (Figura 20 C) hasta la relación 50:50 donde el factor carga comenzó a provocar un efecto en su estructura, incrementando los valores de fluorescencia conforme aumentaba la concentración de PPOG, como puede apreciarse en la (Figura 20 D). Cabe destacar cómo la variante I26A siguió teniendo el mismo comportamiento que se había visto en los estudios anteriores al mostrar una mayor propensión a formar estructuras beta en un ambiente aniónico manteniendo los valores de fluorescencia más altos, incluso con un comportamiento muy similar al de C-ter, lo cual puede deberse a una similitud con su punto isoeléctrico (Figura 20 E y F).



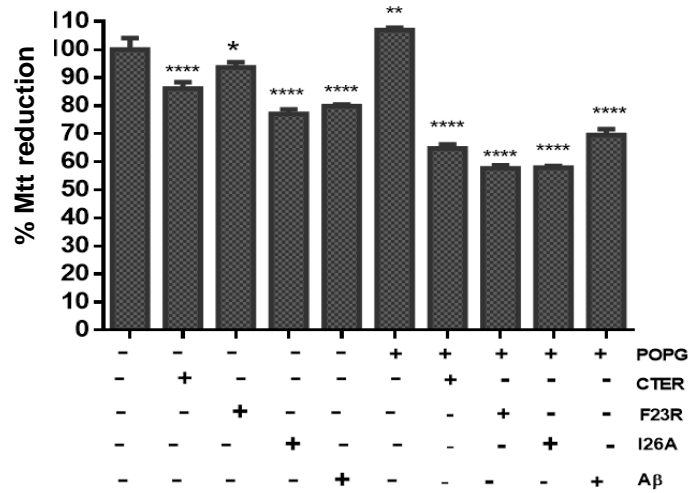
**Figura 20** | Análisis de Fluorescencia con tioflavina T entre C-ter y las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A y PPOG. (A) Interacción de C-ter a diferentes concentraciones de vesículas con PPOG. (B) Representación de la señal emitida por Tht entre C-ter y PPOG en gráfica de barras. (C) Interacción entre F<sub>23</sub>R bajo concentraciones crecientes de PPOG.(D) Señal emitida por Tht entre F<sub>23</sub>R y PPOG en un gráfico de barras. (E) Emisión de Tht al interaccionar I<sub>26</sub>A bajo concentraciones crecientes de PPOG. (F) Representación en gráfico de barras de la señal emitida por Tht al interaccionar I<sub>26</sub>A con PPOG.

### 8.5.2 Prueba de viabilidad celular de POPG con las variantes de la IAPP

De la misma manera que se realizó con la PS, se llevo a cabo la caracterización en un modelo celular de insulinoma de rata (RIN m5F) de la ATCC, manteniendo una relación 1:2 péptido-lípido a pH 7.4, evaluando el efecto citotóxico de las variantes en presencia de POPG (Figura 21). Como parte de los resultados se encontró que todos los péptidos disminuyeron la viabilidad celular en presencia de POPG, a pesar de que ésta por sí misma no tiene efectos citotóxicos.

En este ensayo, POPG tuvo un efecto modulador sobre las variantes F<sub>23</sub>R así como con I<sub>26</sub>A, cuyo cambio estructural derivó en especies citotóxicas que disminuyeron significativamente la viabilidad celular al igual como se venía observando en los ensayos con PS. En el caso de F<sub>23</sub>R este comportamiento pudo deberse a que dicho péptido posee una carga positiva a pH de 7.4 que contribuyó a cambios estructurales, sin embargo bajo este mismo criterio la variante I<sub>26</sub>A posee una carga neta de 0 y un punto isoeléctrico semejante a C-ter lo cual pudo influir en una mayor interacción con POPG.

Por su parte, el estímulo con el péptido A $\beta$  presentó una significativa disminución en la viabilidad celular, sin embargo no lo fue en comparación con las variantes, esto sugiere que las diferencias en la secuencia de sus residuos de aminoácidos son un factor importante que determina la interacción con los lípidos de membrana, por lo que en este caso particular POPG no ejerció el mismo efecto sobre el péptido A $\beta$ . De acuerdo a lo anterior, se observó que un sistema switteriónico-aniónico formado por POPG, puede inducir cambios estructurales sobre aquellos péptidos, induciendo una disminución en la viabilidad celular.



**Figura 21** | Viabilidad celular evaluada por la prueba de MTT en células RIN-m5f bajo el estímulo de los péptidos F<sub>23</sub>R, I<sub>26</sub>A, C-ter y Aβ mediante vesículas de POPG con una relación 1:2, (7.5 μM péptido + 15 μM de lípido respectivamente) Los valores de la media fueron los siguientes, (n = 6, X ± SD) \*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.005

## 9.0 Conclusiones

En el presente estudio se demostró de manera experimental la modulación ejercida por los principales lípidos de la membrana plasmática sobre las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A del dominio C-terminal de la IAPP, partiendo del análisis *in silico* mediante la utilización de plataformas especializadas basadas en algoritmos como Aggrescan, PASTA y Zyaggregator, así como su elección a partir de sus características fisicoquímicas como potenciales inhibidores del proceso de amiloidogénesis.

A pesar de que los resultados obtenidos *in silico* al seleccionar dichas variantes por el programa de Aggrescan fueron muy favorables para F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A, en los ensayos *in vitro* y en modelos celulares tuvieron un comportamiento muy distinto al esperado, siendo F<sub>23</sub>R de manera general el que presentó una menor propensión a la formación de estructuras de tipo beta.

Se observó que el comportamiento entre ambas variantes fué distinto desde el momento de su preparación y estandarización debido a sus características fisicoquímicas.

Considerando los ensayos *in vitro* y el uso de los picos de emisión a 480 nm por fluorescencia con tioflavina T, se logró demostrar que la variante I<sub>26</sub>A con un espectro de emisión de fluorescencia de 859 mantuvo una tendencia a la formación de estructuras beta incluso superando los 653.5 de fluorescencia del fragmento C-terminal. Por su parte

la variante F<sub>23</sub>R mantuvo una menor propensión a generar fibras amiloides con una fluorescencia de 291.3 lo que representa tan solo un 44.5% de estructuras beta respecto al fragmento C-ter. En este caso, los análisis por microscopía de transmisión electrónica fueron importantes para destacar las diferencias estructurales entre C-ter, N-ter y F<sub>23</sub>R *in vitro*.

La fosfatidilcolina no indujo cambios estructurales en la variante F<sub>23</sub>R al presentar una baja tendencia a la agregación. Sin embargo, la variante I<sub>26</sub>A demostró una mayor tendencia a la formación de estructuras amiloides dependiente de la concentración del lípido. En este sentido, el colesterol no presentó una significativa modulación sobre la variante F<sub>23</sub>R, sin embargo persistió la formación de estructuras secundarias en la variante I<sub>26</sub>A.

De forma importante, el análisis con PS reveló una modulación significativa sobre las variantes F<sub>23</sub>R e I<sub>26</sub>A así como el fragmento C-terminal de IAPP, esto con base en los resultados obtenidos por tioflavina T, rojo Congo y espectrofotometría del enlace peptídico a 218nm, donde se confirmó que el ambiente aniónico es un factor crucial que indujo cambios estructurales favoreciendo su agregación. Así mismo, es importante mencionar que bajo estas mismas condiciones, el dominio N-ter no presentó el fenómeno de amiloidogénesis debido a sus características fisicoquímicas. Las pruebas con POPG ayudaron a corroborar lo observado con la PS, debido a que se encontró el mismo comportamiento.

Debido a que la IAPP es un péptido que se sintetiza en las células beta pancreáticas, se eligió un modelo de células de insulinooma de rata RIN-5mF que nos permitió determinar, que el efecto de la carga electrostática negativa presente en la PS y POPG ejerció un cambio estructural importante, el cual condujo a la formación de especies citotóxicas que disminuyeron significativamente la viabilidad celular.

## **10. PERSPECTIVAS**

Para complementar y reforzar las propiedades anti amiloidogénicas de las variantes en estudio se recomendaría realizar pruebas mediante la técnica de resonancia de plasmones de superficie o SPR, la cual permitiría identificar en tiempo real las interacciones moleculares entre el péptido en estudio, bajo un modelo de membrana, evidenciando la forma y disposición de los agregados.

## 11. Referencias bibliográficas

1. Federation ID: **IDF Diabetes Atlas**, 7th Edition edn. Brussels | Belgium; 2015.
2. Salud Sd: **Encuesta Nacional de Salud y Nutrición** In. México; 2016.
3. Rambaran RN, Serpell LC: **Amyloid fibrils: abnormal protein assembly**. *Prion* 2008, **2**(3):112-117.
4. Singh S, Trikha S, Bhowmick DC, Sarkar AA, Jeremic AM: **Role of Cholesterol and Phospholipids in Amylin Misfolding, Aggregation and Etiology of Islet Amyloidosis**. *Adv Exp Med Biol* 2015, **855**:95-116.
5. Acosta-Montano P, Garcia-Gonzalez V: **Effects of Dietary Fatty Acids in Pancreatic Beta Cell Metabolism, Implications in Homeostasis**. *Nutrients* 2018, **10**(4).
6. Engel MF, Yigittop H, Elgersma RC, Rijkers DT, Liskamp RM, de Kruijff B, Hoppener JW, Antoinette Killian J: **Islet amyloid polypeptide inserts into phospholipid monolayers as monomer**. *J Mol Biol* 2006, **356**(3):783-789.
7. Novials A, Sarri Y, Casamitjana R, Rivera F, Gomis R: **Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets**. *Diabetes* 1993, **42**(10):1514-1519.
8. Trikha S, Jeremic AM: **Distinct internalization pathways of human amylin monomers and its cytotoxic oligomers in pancreatic cells**. *PLoS One* 2013, **8**(9):e73080.
9. Nishi M, Sanke T, Seino S, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI, Steiner DF: **Human islet amyloid polypeptide gene: complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and evolutionary history**. *Mol Endocrinol* 1989, **3**(11):1775-1781.
10. Hoppener JW, Oosterwijk C, Nieuwenhuis MG, Posthuma G, Thijssen JH, Vroom TM, Ahren B, Lips CJ: **Extensive islet amyloid formation is induced by development of Type II diabetes mellitus and contributes to its progression: pathogenesis of diabetes in a mouse model**. *Diabetologia* 1999, **42**(4):427-434.
11. Butler PC, Chou J, Carter WB, Wang YN, Bu BH, Chang D, Chang JK, Rizza RA: **Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans**. *Diabetes* 1990, **39**(6):752-756.
12. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM: **The amyloid state and its association with protein misfolding diseases**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**(6):384-396.
13. Koda JE, Fineman M, Rink TJ, Dailey GE, Muchmore DB, Linarelli LG: **Amylin concentrations and glucose control**. *Lancet* 1992, **339**(8802):1179-1180.
14. Hoppener JW, Ahren B, Lips CJ: **Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus**. *N Engl J Med* 2000, **343**(6):411-419.
15. Dechenes CJ, Verchere CB, Andrikopoulos S, Kahn SE: **Human aging is associated with parallel reductions in insulin and amylin release**. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998, **275**(5):E785-E791.
16. Hoppener JW, Lips CJ: **Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus**. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, **38**(5-6):726-736.
17. Knight JD, Miranker AD: **Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly**. *J Mol Biol* 2004, **341**(5):1175-1187.
18. Jayasinghe SA, Langen R: **Lipid membranes modulate the structure of islet amyloid polypeptide**. *Biochemistry* 2005, **44**(36):12113-12119.

19. Knight JD, Hebda JA, Miranker AD: **Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide.** *Biochemistry* 2006, **45**(31):9496-9508.
20. Sasahara K, Hall D, Hamada D: **Effect of lipid type on the binding of lipid vesicles to islet amyloid polypeptide amyloid fibrils.** *Biochemistry* 2010, **49**(14):3040-3048.
21. Caillon L, Lequin O, Khemtémourian L: **Evaluation of membrane models and their composition for islet amyloid polypeptide-membrane aggregation.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1828**(9):2091-2098.
22. Smith PE, Brender JR, Ramamoorthy A: **Induction of negative curvature as a mechanism of cell toxicity by amyloidogenic peptides: the case of islet amyloid polypeptide.** *J Am Chem Soc* 2009, **131**(12):4470-4478.
23. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J: **Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP).** *Int J Mol Sci* 2011, **12**(3):2019-2035.
24. Mendoza-Espinosa P, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J: **Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease.** *Mol Cell Biochem* 2009, **330**(1-2):105-120.
25. Poa NR, Cooper GJ, Edgar PF: **Amylin gene promoter mutations predispose to Type 2 diabetes in New Zealand Maori.** *Diabetologia* 2003, **46**(4):574-578.
26. Berhanu WM, Hansmann UH: **Inter-species cross-seeding: stability and assembly of rat-human amylin aggregates.** *PLoS One* 2014, **9**(5):e97051.
27. Singh-Franco D, Robles G, Gazze D: **Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus.** *Clin Ther* 2007, **29**(4):535-562.
28. Bretscher MS: **Membrane structure: some general principles.** *Science* 1973, **181**(4100):622-629.
29. Platre MP, Jaillais Y: **Anionic lipids and the maintenance of membrane electrostatics in eukaryotes.** *Plant Signal Behav* 2017, **12**(2):e1282022.
30. Meza U RMA, Licon Y, Sanchez A.S. : **La membrana plasmática: Modelo, balsas y señalización.** 2010, **29**(4):125-134
31. Sciacca MF, Brender JR, Lee DK, Ramamoorthy A: **Phosphatidylethanolamine enhances amyloid fiber-dependent membrane fragmentation.** *Biochemistry* 2012, **51**(39):7676-7684.
32. Devlin: **Bioquímica**, 4 edn. España: Reverte; 2004.
33. Anantharamaiah GM1 GD, White CR.: **Apolipoprotein Mimetic Peptides as Modulators of Lipoprotein Function.** *Protein Pept Lett* 2016, **23**(11):1024-1031.
34. Westermark GT, Westermark P: **Islet amyloid polypeptide and diabetes.** *Curr Protein Pept Sci* 2013, **14**(4):330-337.
35. Meng F, Abedini A, Song B, Raleigh DP: **Amyloid formation by pro-islet amyloid polypeptide processing intermediates: examination of the role of protein heparan sulfate interactions and implications for islet amyloid formation in type 2 diabetes.** *Biochemistry* 2007, **46**(43):12091-12099.
36. Jha S, Patil SM, Gibson J, Nelson CE, Alder NN, Alexandrescu AT: **Mechanism of amylin fibrillization enhancement by heparin.** *J Biol Chem* 2011, **286**(26):22894-22904.
37. Hebda JA, Miranker AD: **The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers: insights from type II diabetes.** *Annu Rev Biophys* 2009, **38**:125-152.
38. Weise K, Radovan D, Gohlke A, Opitz N, Winter R: **Interaction of hIAPP with model raft membranes and pancreatic beta-cells: cytotoxicity of hIAPP oligomers.** *ChemBiochem* 2010, **11**(9):1280-1290.

39. Panchal M, Loeper J, Cossec JC, Perruchini C, Lazar A, Pompon D, Duyckaerts C: **Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry.** *J Lipid Res* 2010, **51**(3):598-605.
40. Lee SC, Hashim Y, Li JK, Ko GT, Critchley JA, Cockram CS, Chan JC: **The islet amyloid polypeptide (amylin) gene S20G mutation in Chinese subjects: evidence for associations with type 2 diabetes and cholesterol levels.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001, **54**(4):541-546.
41. Andreola A, Bellotti V, Giorgetti S, Mangione P, Obici L, Stoppini M, Torres J, Monzani E, Merlini G, Sunde M: **Conformational switching and fibrillogenesis in the amyloidogenic fragment of apolipoprotein a-I.** *J Biol Chem* 2003, **278**(4):2444-2451.
42. Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J: **Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **365**(1):8-15.
43. Ookoshi T, Hasegawa K, Ohhashi Y, Kimura H, Takahashi N, Yoshida H, Miyazaki R, Goto Y, Naiki H: **Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH.** *Nephrol Dial Transplant* 2008, **23**(10):3247-3255.
44. Pal-Gabor H, Gombos L, Micsonai A, Kovacs E, Petrik E, Kovacs J, Graf L, Fidy J, Naiki H, Goto Y *et al*: **Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of beta(2)-microglobulin in vitro under physiological conditions.** *Biochemistry* 2009, **48**(24):5689-5699.
45. Uversky VN, Oldfield CJ, Midic U, Xie H, Xue B, Vucetic S, Iakoucheva LM, Obradovic Z, Dunker AK: **Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases.** *BMC Genomics* 2009, **10** Suppl 1:S7.
46. Berson JF, Theos AC, Harper DC, Tenza D, Raposo G, Marks MS: **Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis.** *J Cell Biol* 2003, **161**(3):521-533.
47. García-González: **The C-terminal Domain Supports a Novel Function for CETPI as a New Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein.** *Sci Rep* 2015, **5**(16091).
48. García-González: **Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity.** *J Struct Biol* 2014, **186**(1):19-27.
49. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J: **Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **434**(1):54-59.
50. Xicohtencatl-Cortes J, Castillo R, Mas-Oliva J: **In search of new structural states of exchangeable apolipoproteins.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **324**(2):467-470.
51. Roco MC: **Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine.** *Curr Opin Biotechnol* 2003, **14**(3):337-346.
52. Márquez-Miranda V1 CM, Araya-Durán I1, Varas-Concha I3, Almonacid DE4, González-Nilo FD5.: **Biomimetics: From Bioinformatics to Rational Design of Dendrimers as Gene Carriers.** *PLoS One* 2015, **10**(9).
53. Wang H, Ridgway Z, Cao P, Ruzsicska B, Raleigh DP: **Analysis of the ability of pramlintide to inhibit amyloid formation by human islet amyloid polypeptide reveals a balance between optimal recognition and reduced amyloidogenicity.** *Biochemistry* 2015, **54**(44):6704-6711.
54. Pulido-Capiz A, Diaz-Molina R, Martinez-Navarro I, Guevara-Olaya LA, Casanueva-Perez E, Mas-Oliva J, Rivero IA, Garcia-Gonzalez V: **Modulation of Amyloidogenesis Controlled by the C-Terminal Domain of Islet Amyloid Polypeptide Shows New Functions on Hepatocyte Cholesterol Metabolism.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018, **9**:331.
55. Jenssen H, Aspmo SI: **Serum stability of peptides.** *Methods Mol Biol* 2008, **494**:177-186.

56. Frydman-Marom A, Shaltiel-Karyo R, Moshe S, Gazit E: **The generic amyloid formation inhibition effect of a designed small aromatic beta-breaking peptide.** *Amyloid* 2011, **18**(3):119-127.
57. Porat Y, Mazor Y, Efrat S, Gazit E: **Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation: a potential role for heteroaromatic interactions.** *Biochemistry* 2004, **43**(45):14454-14462.
58. Walsh I, Seno F, Tosatto SC, Trovato A: **PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**(Web Server issue):W301-307.
59. Baldi P, Brunak S, Frasconi P, Soda G, Pollastri G: **Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction.** *Bioinformatics* 1999, **15**(11):937-946.
60. Tartaglia GG, Pawar AP, Campioni S, Dobson CM, Chiti F, Vendruscolo M: **Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins.** *J Mol Biol* 2008, **380**(2):425-436.
61. DuBay KF, Pawar AP, Chiti F, Zurdo J, Dobson CM, Vendruscolo M: **Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains.** *J Mol Biol* 2004, **341**(5):1317-1326.
62. Copeland RA, Spiro TG: **Secondary structure determination in proteins from deep (192-223-nm) ultraviolet Raman spectroscopy.** *Biochemistry* 1987, **26**(8):2134-2139.
63. Klunk WE1 JR, Mason RP.: **Quantifying amyloid beta-peptide (Abeta) aggregation using the Congo red-Abeta (CR-abeta) spectrophotometric assay.** *Anal Biochem* 1999, **266**(1):66-76.
64. Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL: **Is Congo red an amyloid-specific dye?** *J Biol Chem* 2001, **276**(25):22715-22721.
65. Turnell WG, Finch JT: **Binding of the dye congo red to the amyloid protein pig insulin reveals a novel homology amongst amyloid-forming peptide sequences.** *J Mol Biol* 1992, **227**(4):1205-1223.
66. Carter DB, Chou KC: **A model for structure-dependent binding of Congo red to Alzheimer beta-amyloid fibrils.** *Neurobiol Aging* 1998, **19**(1):37-40.
67. Nilsson MR: **Techniques to study amyloid fibril formation in vitro.** *Methods* 2004, **34**(1):151-160.
68. Cubillos-Rojas M, Amair-Pinedo F, Tato I, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL: **Tris-acetate polyacrylamide gradient gels for the simultaneous electrophoretic analysis of proteins of very high and low molecular mass.** *Methods Mol Biol* 2012, **869**:205-213.
69. Biancalana M, Koide S: **Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1804**(7):1405-1412.
70. Kitts CC, Vanden Bout DA: **Near-field scanning optical microscopy measurements of fluorescent molecular probes binding to insulin amyloid fibrils.** *J Phys Chem B* 2009, **113**(35):12090-12095.
71. Patil SM, Alexandrescu AT: **Charge-Based Inhibitors of Amylin Fibrillization and Toxicity.** *J Diabetes Res* 2015, **2015**:946037.
72. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Refregiers M, Kardos J: **Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**(24):E3095-3103.
73. Finkelstein AV, Dovidchenko NV, Galzitskaya OV: **[Anomalous Kinetics of Amyloidogenesis Suggest a Competition between Oligomers and Fibrils].** *Mol Biol (Mosk)* 2018, **52**(1):73-81.
74. Krishnamurthy PK, Rajamohamedsait HB, Gonzalez V, Rajamohamedsait WJ, Ahmed N, Krishnaswamy S, Sigurdsson EM: **Sex and Immunogen-Specific Benefits of Immunotherapy Targeting Islet Amyloid Polypeptide in Transgenic and Wild-Type Mice.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016, **7**:62.

75. Balbach JJ, Ishii Y, Antzutkin ON, Leapman RD, Rizzo NW, Dyda F, Reed J, Tycko R: **Amyloid fibril formation by A beta 16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's beta-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR.** *Biochemistry* 2000, **39**(45):13748-13759.
76. Ilitchev AI, Giammona MJ, Do TD, Wong AG, Buratto SK, Shea JE, Raleigh DP, Bowers MT: **Human Islet Amyloid Polypeptide N-Terminus Fragment Self-Assembly: Effect of Conserved Disulfide Bond on Aggregation Propensity.** *J Am Soc Mass Spectrom* 2016, **27**(6):1010-1018.
77. Sun HY, Deng G, Jiang YW, Zhou Y, Xu J, Wu FG, Yu ZW: **Controllable engineering of asymmetric phosphatidylserine-containing lipid vesicles using calcium cations.** *Chem Commun (Camb)* 2017, **53**(95):12762-12765.
78. Cho WJ, Trikha S, Jeremic AM: **Cholesterol regulates assembly of human islet amyloid polypeptide on model membranes.** *J Mol Biol* 2009, **393**(3):765-775.
79. Ingolfsson HI, Melo MN, van Eerden FJ, Arnarez C, Lopez CA, Wassenaar TA, Periolo X, de Vries AH, Tieleman DP, Marrink SJ: **Lipid organization of the plasma membrane.** *J Am Chem Soc* 2014, **136**(41):14554-14559.
80. Cho WJ, Jena BP, Jeremic AM: **Nano-scale imaging and dynamics of amylin-membrane interactions and its implication in type II diabetes mellitus.** *Methods Cell Biol* 2008, **90**:267-286.
81. Simons K, Toomre D: **Lipid rafts and signal transduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**(1):31-39.
82. Xu W, Wei G, Su H, Nordenskiöld L, Mu Y: **Effects of cholesterol on pore formation in lipid bilayers induced by human islet amyloid polypeptide fragments: a coarse-grained molecular dynamics study.** *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2011, **84**(5 Pt 1):051922.
83. Sasahara K, Morigaki K, Shinya K: **Amyloid aggregation and deposition of human islet amyloid polypeptide at membrane interfaces.** *FEBS J* 2014, **281**(11):2597-2612.
84. Cope SM, Shinde S, Best RB, Ghirlanda G, Vaiana SM: **Cyclic N-terminal loop of amylin forms non amyloid fibers.** *Biophys J* 2013, **105**(7):1661-1669.
85. Skeby KK, Andersen OJ, Pogorelov TV, Tajkhorshid E, Schiott B: **Conformational Dynamics of the Human Islet Amyloid Polypeptide in a Membrane Environment: Toward the Aggregation Prone Form.** *Biochemistry* 2016, **55**(13):2031-2042.
86. Jiang L, Allagnat F, Nguidjoe E, Kamagate A, Pachera N, Vanderwinden JM, Brini M, Carafoli E, Eizirik DL, Cardozo AK *et al*: **Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase overexpression depletes both mitochondrial and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> stores and triggers apoptosis in insulin-secreting BRIN-BD11 cells.** *J Biol Chem* 2010, **285**(40):30634-30643.
87. Kelly JW: **Mechanisms of amyloidogenesis.** *Nat Struct Biol* 2000, **7**(10):824-826.
88. Xue WF, Homans SW, Radford SE: **Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(26):8926-8931.
89. DeToma AS, Salamekh S, Ramamoorthy A, Lim MH: **Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes.** *Chem Soc Rev* 2012, **41**(2):608-621.
90. Morris C, Cupples S, Kent TW, Elbassal EA, Wojcikiewicz EP, Yi P, Du D: **N-Terminal Charged Residues of Amyloid-beta Peptide Modulate Amyloidogenesis and Interaction with Lipid Membrane.** *Chemistry* 2018, **24**(38):9494-9498.
91. Glabe CG, Kaye R: **Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis.** *Neurology* 2006, **66**(2 Suppl 1):S74-78.

92. Lesne SE, Sherman MA, Grant M, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA, Ashe KH: **Brain amyloid-beta oligomers in ageing and Alzheimer's disease.** *Brain* 2013, **136**(Pt 5):1383-1398.
93. Salas M, Silvestre RA, Garcia-Hermida O, Fontela T, Rodriguez-Gallardo J, Marco J: **Inhibitory effect of amylin (islet amyloid polypeptide) on insulin response to non-glucose stimuli. Study in perfused rat pancreas.** *Diabete Metab* 1995, **21**(4):269-273.
94. Ohsawa H, Kanatsuka A, Yamaguchi T, Makino H, Yoshida S: **Islet amyloid polypeptide inhibits glucose-stimulated insulin secretion from isolated rat pancreatic islets.** *Biochem Biophys Res Commun* 1989, **160**(2):961-967.
95. Zhu T, Wang Y, He B, Zang J, He Q, Zhang W: **Islet amyloid polypeptide acts on glucose-stimulated beta cells to reduce voltage-gated calcium channel activation, intracellular Ca(2+) concentration, and insulin secretion.** *Diabetes Metab Res Rev* 2011, **27**(1):28-34.
96. Konarkowska B, Aitken JF, Kistler J, Zhang S, Cooper GJ: **The aggregation potential of human amylin determines its cytotoxicity towards islet beta-cells.** *FEBS J* 2006, **273**(15):3614-3624.
97. Vamparys L, Gautier R, Vanni S, Bennett WF, Tieleman DP, Antonny B, Etchebest C, Fuchs PF: **Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature.** *Biophys J* 2013, **104**(3):585-593.
98. Dong X, Qiao Q, Qian Z, Wei G: **Recent computational studies of membrane interaction and disruption of human islet amyloid polypeptide: Monomers, oligomers and protofibrils.** *Biochim Biophys Acta* 2018.

## 12. Anexos

En un modelo de células hepáticas de rata C9 (clona 9, CTRL-1439 de la ATCC), se realizaron pruebas de reducción de MTT para los cuales la variante F<sub>23</sub>R no mostró efectos citotóxicos de forma individual, sin embargo al evaluar el efecto de C-ter, éste no logró atenuar el daño celular provocando una disminución de la viabilidad hasta un 90%. Así mismo en el estudio de expresión de proteínas por western blot se descubrió que tanto la variante F<sub>23</sub>R como C-ter tuvieron un importante impacto en la regulación del metabolismo del colesterol, al incrementar la expresión del receptor de unión a esterol SREBP-2 así como del transportador ABCA1 y LDLR lo cual no había sido reportado anteriormente (Figura 22), se encontraba expresado notablemente tanto con C-ter como con F<sub>23</sub>R en las células C9.

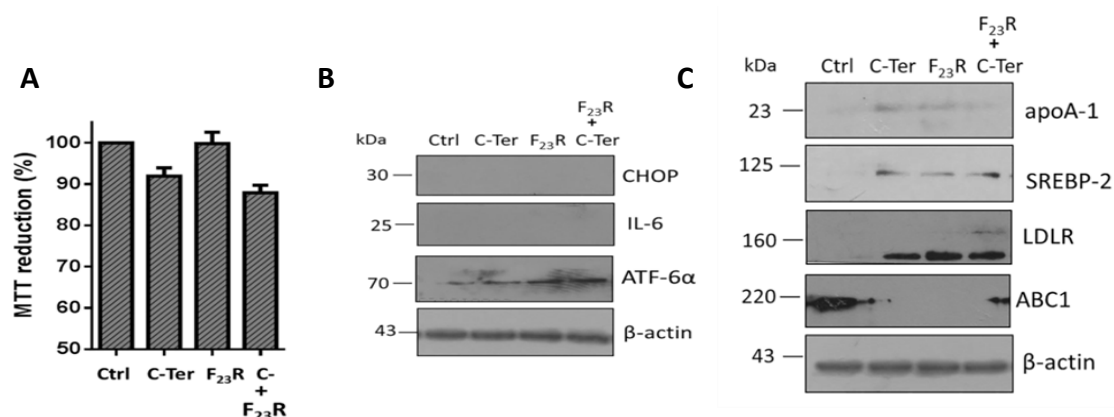


Figura 22 | Análisis de reducción de MTT y expresión de proteínas en un modelo de hepatocitos C9 mediante Wester blot (A) prueba de viabilidad mediante estímulo con C-ter y la variante F<sub>23</sub>R (B) Activación de la vía de ATF-6α C. Expresión de proteínas clave en la regulación de colesterol.

Derivado del trabajo realizado dentro del posgrado se publicaron los siguientes artículos en la revistas *Frontiers in Endocrinology* además de un Review en el *International Journal of Molecular Science*, los cuales anexo a continuación:



# Modulation of Amyloidogenesis Controlled by the C-Terminal Domain of Islet Amyloid Polypeptide Shows New Functions on Hepatocyte Cholesterol Metabolism

Angel Pulido-Capiz<sup>1</sup>, Raúl Díaz-Molina<sup>1</sup>, Israel Martínez-Navarro<sup>1,2</sup>,  
Lizbeth A. Guevara-Olaya<sup>1</sup>, Enrique Casanueva-Pérez<sup>1</sup>, Jaime Mas-Oliva<sup>3</sup>,  
Ignacio A. Rivero<sup>4</sup> and Víctor García-González<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Mexico, <sup>2</sup>Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, <sup>4</sup>Centro de Graduados e Investigación en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Paul Thomas Pfluger,  
Helmholtz Zentrum München –  
Deutsches Forschungszentrum für  
Gesundheit und Umwelt, Germany

### Reviewed by:

Thomas Lloyd Williams,  
Clarivate Analytics, United States  
Marta Letizia Hribal,  
Università degli studi Magna Græcia  
di Catanzaro, Italy

### \*Correspondence:

Victor García-González  
vgarcia62@uabc.edu.mx

### Specialty section:

This article was submitted  
to Cellular Endocrinology,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 08 February 2018

**Accepted:** 31 May 2018

**Published:** 25 June 2018

### Citation:

Pulido-Capiz A, Díaz-Molina R,  
Martínez-Navarro I, Guevara-  
Olaya LA, Casanueva-Pérez E,  
Mas-Oliva J, Rivero IA and  
García-González V (2018) Modulation  
of Amyloidogenesis Controlled by the  
C-Terminal Domain of Islet Amyloid  
Polypeptide Shows New Functions  
on Hepatocyte Cholesterol  
Metabolism.  
*Front. Endocrinol.* 9:331.  
doi: 10.3389/fendo.2018.00331

The islet amyloid polypeptide (IAPP) or amylin maintains a key role in metabolism. This 37-residues-peptide could form pancreatic amyloids, which are a characteristic feature of diabetes mellitus type 2. However, some species do not form amyloid fibril structures. By employing a biomimetic approach, we generated an extensive panel of optimized sequences of IAPP, which could drastically reduce aggregation propensity. A structural and cellular characterization analysis was performed on the C-terminal domain with the highest aggregation propensity. This allowed the observation of an aggregative phenomenon dependent of the lipid environment. Evaluation of the new F<sub>23</sub>R variant demonstrated inhibition of  $\beta$ -sheet structure and, therefore, amyloid formation on the native C-terminal, phenomenon that was associated with functional optimization in calcium and cholesterol management coupled with the optimization of insulin secretion by beta cells. When F<sub>23</sub>R variant was evaluated in microglia cells, a model of amyloidosis, cytotoxic conditions were not registered. In addition, it was found that C-terminal sequences of IAPP could modulate cholesterol metabolism in hepatocytes through regulation of SREBP-2, apoA-1, ABCA1, and LDLR, mechanism that may represent a new function of IAPP on the metabolism of cholesterol, increasing the LDL endocytosis in hepatocytes. Optimized sequences with only one residue modification in the C-terminal core aggregation could diminish  $\beta$ -sheet formation and represent a novel strategy adaptable to other pharmacological targets. Our data suggest a new IAPP function associated with rearrangements on metabolism of cholesterol in hepatocytes.

**Keywords:** IAPP, amyloids, cholesterol, hepatocytes, metabolism, diabetes mellitus type 2, biomimetics, insulin

## INTRODUCTION

Exacerbated perturbation of protein homeostasis (proteostasis) could lead to a phenomenon considered as protein metastasis (1, 2). Initial events of misfolding and amyloid aggregation trigger a cascade of pathological processes that could mark the progression of chronic-degenerative diseases (3, 4), in association with conditions of metabolic overload due to the excess of nutrients. These conditions are

important in diseases such as diabetes mellitus type 2 (DM2), a pathological condition associated with reduced quality of insulin synthesis, impaired insulin sensitivity in peripheral tissues, and the presence of amyloid-like fibrils composed of human amylin (hIAPP) that affect  $\beta$ -cell function.

hIAPP is a peptide hormone of 37 residues that slows down gastric emptying, participates in the homeostatic regulation of glucose, and functions as a glucagon-release inhibitor and a sensitizer of leptin function (5, 6). In addition, data generated by our group suggest a regulatory function of IAPP in hepatic cholesterol metabolism. hIAPP is a monomeric peptide processed in the Golgi apparatus and co-secreted with insulin in response to  $\beta$ -cell secretagogues (7). Amyloid aggregation of hIAPP triggers an amplified toxicity response that can lead to failure of pancreatic  $\beta$ -cells. In this case, extracellular hIAPP amyloids could induce endoplasmic reticulum (ER) stress. In the lumen, ER stress is detected by IRE1, PERK, and ATF6 $\alpha$ , a tripartite signaling system denominated the unfolded protein response (UPR). The UPR regulates gene expression to resolve the ER stress and maintain proteostasis by the signaling of ER-nucleus cascades through factors such as N-ATF6 $\alpha$ , XBP1s, and CHOP (8). The overactivation of the UPR can promote  $\beta$ -cell dysfunction (9).

Different variants are involved in alterations of amyloid structures *in vivo*. For instance, the S<sub>20</sub>G mutation has been found in Asian populations and associated with early cases of DM2 accelerating the formation of amyloid structures (10, 11). Also several variants have been reported in Maori populations of New Zealand (12). Moreover, rat IAPP (rIAPP) shows a diminished trend to produce amyloid fibrils, the differences among human and rat sequences are six residues (H<sub>18</sub>R, F<sub>23</sub>L, A<sub>25</sub>P, I<sub>26</sub>V, S<sub>28</sub>P, and S<sub>29</sub>P), all located in segments 18–29 (13). Several reports suggest that the 23–37 domain may be key in the structural transitions that trigger the formation of amyloid fibrils (13, 14).

A nature-based approach, i.e., biomimetics associated with the adaptation of models inspired by biology, has been the basis for the generation of new systems or materials (15). The tendency to form IAPP-amyloid structures of hundreds of organisms has not been completely analyzed. A characterization of IAPP sequences could provide the basis for a better understanding of the aggregation phenomenon and the cellular response mechanisms to IAPP. Therefore, the development of improved sequences might serve as a source for optimized pharmacological treatments that may reduce the formation of  $\beta$ -sheet structures.

## MATERIALS AND METHODS

### Analysis of Sequences

Employing the term islet amyloid polypeptide (IAPP) in the searching protein database of the NCBI, 314 sequences were found, which correspond to 284 eukaryotes and another 30 associated sequences (16). In this approach and through different filters, we considered only 240 of the 284 that integrate the characterized, predicted, and partial sequences. Using several specialized platforms, algorithms-predictors of beta-sheet aggregation and amyloid fibril formation, we described the correlation that presents hIAPP sequence with respect to the other organisms.

### Physicochemical Parameters

Physicochemical analysis of IAPP sequences was performed, included hydrophobic moment ( $\mu$ H), net electrostatic charge, average hydrophobicity, theoretical average rate of aggregation, isoelectric point (pI), and patterns including residues promoting membrane interactions, which have been described modulate phenomena such as self-assembling and misfolded aggregation (17, 18). Additionally, the management of IAPP fragments through the N-domain <sup>1</sup>KCNTATCATQRLANFLV<sup>17</sup> and C-domain <sup>17</sup>VHSSNFGAILSSTNVGSNTY<sup>37</sup> was performed.

### Characterization of Aggregation Propensity

We employed several algorithms that enable the identification of regions with a high intrinsic propensity to aggregation. IAPP sequences were characterized through multiple alignments by the use of specialized platforms such as Aggrescan (19), PASTA 2.0 (20), and Zyaggregator (21, 22).

### Phylogenetic Tree Construction

Sequence similarity search was realized with the method “Basic Local Alignment Search Tool protein” (BLASTp), which performs protein–protein sequence comparison and employ heuristic model (20, 23). In addition, other strategies were used to reconstruct the phylogenetic tree as the NJ method and ClustalX software (24, 25).

### Sequences Designed *De Novo*

Based on network analysis, different residues among species were replaced on the sequence of IAPP. Then, the effect of substitution was characterized through physicochemical and aggregative parameters. Aggregation propensity range was obtained by consider the aggregation value of hIAPP as a reference, this based in Aggrescan values (Na4vSS).

### Materials

Cell culture reagents were purchased from Gibco-Invitrogen, while tissue culture plates and other plastic materials were obtained from Corning. Salts and buffers were obtained from Sigma-Aldrich, as well as thioflavin T (ThT), black Sudan B, Congo-red, SDS, [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] tetrazolium (MTT), tunicamycin (Tum), and lipopolysaccharides O111:B4 (LPS). L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC), 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (LPA) were obtained from Avanti Polar Lipids.

### Peptide Synthesis and Preparation

Several peptides were synthesized (GenScript) considering the amino acid sequence of IAPP and physicochemical properties. Specifically, the following sequences were characterized: <sup>1</sup>KCNTATCATQRLANFLVHSS<sup>20</sup> (N-terminal native); <sup>23</sup>FGAILSSTNVGSNTY<sup>37</sup> (C-terminal native), a region described with a high tendency to aggregation, and <sup>23</sup>RGAILSSTNVGSNTY<sup>37</sup> (F<sub>23</sub>R variant). The best condition for peptide solubilization was ultrapure H<sub>2</sub>O (0.6 mg/mL), subsequently diluted to phosphate buffer pH 7.2 (0.06 mg/mL). Peptide purity greater than 98% was

confirmed by mass spectrometry and HPLC analysis (GenScript). Likewise, the aggregative core of amyloid beta (A $\beta$ ) was used as a control <sup>25</sup>GSNKGAIIGLM<sup>35</sup>. All solutions were filtered by membranes with a pore size of 0.22  $\mu$ m.

## Lipid Vesicles

The lipid effect on peptide structure was performed using ThT-fluorescence, peptide bond spectroscopy, and biochemical techniques. Lipids were mixed in chloroform and dried for 1 h under a gentle stream of N<sub>2</sub> with an additional incubation of 5 h at 30°C in a Speed Vac concentrator, according to protocols established by our working group (4). After drying, lipids were resuspended in a phosphate buffer and subsequently sonicated with four cycles of 10 min (15 s on/30 s off pulses) in an ice bath under a N<sub>2</sub> flow. Samples were incubated 2 h at room temperature and then centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. Solution of small unilamellar vesicles obtained was kept at 4°C until use, previously characterized by transmission electron microscopy (18).

## Peptide-Bond Conformational Changes

Experimentation was performed through characterization of absorbance at 218 nm, associated with changes in the conformation of the peptide-bond, a parameter of conformational changes in the formation of beta-sheet structures (4, 18). Measurements were obtained using a BioRad Smart spectrophotometer with diode array.

## Congo-Red Birefringence Spectroscopy

Assays were performed based on the protocol of Ref. (26) and adapted by our group in several papers. Employing 10.6  $\mu$ M of Congo-red and 60  $\mu$ g/mL of peptides under the different conditions evaluated, the optical density was measured every 2 nm from 400 to 700 nm.

## ThT Fluorescence

Beta-sheet structures in peptides were characterized with ThT fluorescence assay. Fluorescence emission spectra were registered at 25°C from 460 to 610 nm with an excitation wavelength of 450 nm in a Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer.

## Circular Dichroism (CD)

Circular dichroism spectra were recorded with an AVIV 62DS spectropolarimeter (AVIV Instruments) at 25°C employing far UV wavelengths (190–260 nm). Experiments were conducted at a peptide concentration of 120  $\mu$ g/mL in a 1 mm quartz path length cuvette using AVIV software. Spectra were recorded with a 1 mm bandwidth, using 1 nm increments and 2.5 s accumulation time. CD results were reported as mean molar ellipticity (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>).

## Electronic Microscopy Experimentation

Peptide samples incubated under the different conditions tested (2  $\mu$ L) were deposited on Formvar-Carbon TEM grids, copper 300 mesh; and after incubation for 2 min at 25°C, excess liquid was removed with Whatman paper. Peptide concentrations were adjusted to 60  $\mu$ g/mL in 20  $\mu$ M phosphates buffer pH 7.4. Images were acquired using a JEOL-7800F Prime Field Emission

Scanning electron microscopy with scanning transmission electron microscopy detector at 30.0 kV.

## Lipid–Peptide Interactions

Lipid/peptide samples were analyzed on non-denaturing electrophoresis, technique adapted by our group in lipid–peptide characterization (27). We established a new methodology through the use of 0.8–15% native gradient gel electrophoresis. Later, gradient gels were stained with Sudan-black and silver protocols, according to previous work (28).

## Cell Culture

RIN-m5F beta cells (Langerhans islets, ATCC) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS). Likewise, microglia cells (EOC) were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 20% LADMAC conditioned media (produced from the LADMAC cell line, rich in growth factor colony stimulating factor 1). In a complementary way, we used hepatocytes (C9 cells) in DMEM medium with FBS 10%. Penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50 g/mL) were added to the media.

## Cell Viability Assay

Peptide cytotoxicity was assessed by MTT reduction assays in cell cultures, under different peptide and lipid–peptide treatments. Cells were seeded into 96-well plates at a density of 20,000 cells/well and allowed to grow to 90% of confluence. Next, culture medium was replaced with Opti-MEM medium. After 1 h under this condition, cells were incubated under the different treatments, and subsequently processed according to previous protocols (4).

## Preparation of Lipopolysaccharides (LPS)

LPS O111:B4 were diluted in ultrapure H<sub>2</sub>O at a concentration of 1  $\times$  10<sup>6</sup> ng/mL sonicated for 10 min, filtered by 0.22  $\mu$ m, and subsequently diluted in culture medium at different concentrations.

## Preparation of Fatty Acids (FA)

Palmitic acid (PA) and oleic acid (OA) were prepared in an ethanol/H<sub>2</sub>O solution (1:1; vol:vol) at 60°C to reach a final concentration of 75 mM. Subsequently, PA and OA were incubated with free fatty acid-bovine serum albumin (BSA) for 2 h at 37°C, filtered by 0.22  $\mu$ m, and then diluted in culture medium under different concentrations with a final molar ratio of 4:1 (FA/BSA), before adding the treatment to the culture plates.

## Western Blot

For the evaluation of cholesterol metabolism and UPR pathway, cell cultures were maintained in proliferation until 90% of confluence, then, cells were incubated under different treatments for 16 and 24 h. Cells were washed with PBS and lysed for 35 min at 4°C with protein buffer lysis supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Further to centrifugation at 8,500 rpm for 8 min, the supernatant was recovered and the protein quantification was carried out using the bicinchoninic acid procedure. Samples (20  $\mu$ g/lane) from the total protein fraction were analyzed by SDS-PAGE on 10% gels, further transferred to PVDF membranes (Millipore). Membranes were incubated 1 h at 37°C

in a solution containing TBS, 0.1% tween-20, and 5% non-fat milk (blocking solution). For protein detection, the following primary antibodies were used: anti-PMCA-ATPase, anti-CHOP, anti-IL-6, anti-LDLR, anti-SREBP2, anti-ABCA1, anti-apoA1, anti-N-ATF6 $\alpha$ , anti-XBPIs, and anti  $\beta$ -actin as a loading control. Blocked membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. After washing, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were incubated with the membrane for 1 h at 37°C in blocking solution. The secondary antibodies used were: donkey anti-goat IgG, goat anti-rabbit IgG, and goat anti-mouse IgG. Later, membranes were washed with TBS/0.1% tween and HRP activity detected with the Immobilon Western kit (Millipore).

## Determination of Insulin

Supernatant media of RIN-m5F cells under different treatments were recovered and then centrifuged at 5,000 rpm for 2 min. Recovered supernatants were diluted with PBS. Subsequently, employing the ALPCO insulin quantification kit (80-INSHUU-E01) with a sensitivity of 0.002 ng/mL, the insulin determination was performed as specified by manufacturer.

## LDL Fraction

Human plasma sample was obtained from a healthy donor in the Facultad de Medicina Mexicali, which signed an informed consent. All protocols were performed according to the Declaration of Helsinki. To isolate LDL, plasma density was adjusted to a 1.019–1.063 g/mL by adding KBr and then centrifuged at 360,000 g for 8 h at 4°C. The layer containing VLDL and IDL was discarded. LDL fraction was recovered and dialyzed in 150 mM NaCl solution, filtered through 0.45  $\mu$ m, and maintained under a nitrogen atmosphere at 4°C to reduce oxidation. Native LDL concentration was measured with the bicinchoninic acid method. Labeling of LDL with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine-perchlorate (DilC18) (Molecular Probes) was performed by incubation of probe 15  $\mu$ g for 1 mg of LDL-protein, 8 h at 25°C (dil-LDL). Then, solution was adjusted to a density solution of 1.053 g/mL and centrifuged 90,000 rpm for 3 h. The dil-LDL fraction was recovered and dialyzed to PBS. Protein determination was performed and dil-LDL was employed in hepatocyte experimentation (29).

## Cell Cytometer Assays

Prior to the internalization experiments, hepatocyte cultures at 90% confluence were incubated in FBS-free medium. After 1 h of fasting, cells were treated with different fragments of IAPP, then, cells were incubated with dil-LDL (3  $\mu$ g/mL) for 24 h. Cellular characterization was performed in a Beckman-Coulter cytometer, 20,000 events were registered. To measure fluorescence of dil-LDL fluorescence, a PC5.5-a filter was employed.

## RESULTS

### Importance of Regions 17–31 in IAPP Sequences

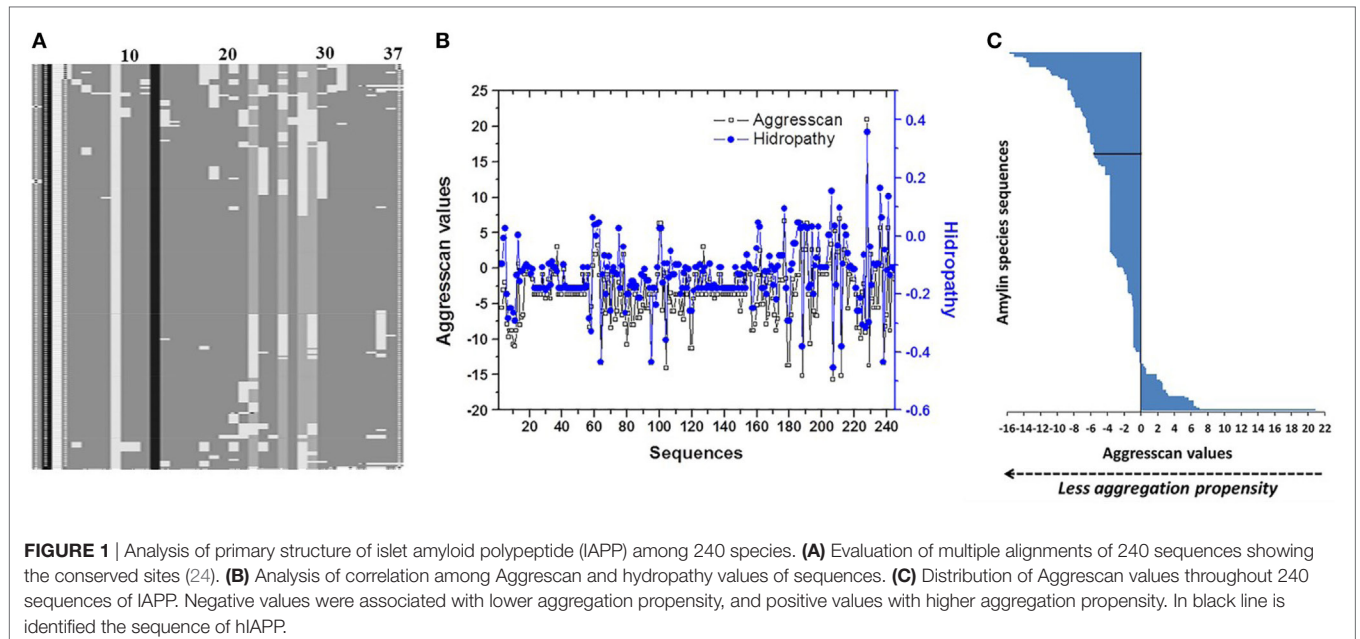
A panel of 240 IAPP sequences was selected according to the criteria described in Section “Materials and Methods,” the most

important groups were distributed by class such as mammalia (97 sequences), aves (103), actinopterygii (25), and sauropsida (12). Specifically, aves class was distributed more evenly among 36 different orders, followed by mammalia composed of two main groups, primates and rodentia (Table S1 in Supplementary Material). Alignments in 240 IAPP sequences suggests that the N-terminal domain (1–17 residues) was conserved in almost all sequences, showing minimal changes (Figure 1A), highly conserved residues were C<sub>2</sub>, L<sub>12</sub>, and L<sub>16</sub>. However, some positions showed the highest number of variants among species such as residue S<sub>29</sub> with 211 sequences, H<sub>18</sub> with 209, F<sub>23</sub> with 206, and A<sub>8</sub> with 168 (Table 1). The regions 17–31 concentrated 74% of total variants (1,187 of 1,640), showing the greatest degree of variability. Employing the bioinformatics platform BLASTp, a high correlation was found among 49 sequences aligned in the N-terminal (residues 1–17 of hIAPP) with at least 88% of identity, compared to the C-domain (residues 23–37), which was only found in 11 sequences with 90% of identity, corresponding to primates. Additionally, based on phylogenetic tree analysis and multiple alignments among N- and C-domains in 240 sequences, the N-domain was conserved among a wide variety of organisms. On the other hand, C-domain was restricted to phylogenetically close groups (Figure S1 in Supplementary Material). The C-terminal domain of hIAPP could show major structural modifications and possibly a domain where conformational changes trigger beta-sheet formation. Specifically, regions 23–31 represent the site where protein frustration takes place, indicating that it could be the key for the binding of ligands (30, 31). Thus, residue modifications in this region could reduce protein frustration, originating a stable core of protein folding and slowing down interactions among monomers.

### Characterization of the Propensity to Amyloid Fibril Formation

Analysis of hydrophathy values regarding the aggregation propensity index obtained with the Aggrescan algorithm (Na4vSS value) identified a correlation among the values of these variables (Pearson 0.82) (Figure 1B). This correlation was not displayed when values of parameters such as  $\mu$ H, average hydrophobicity, or isoelectric point, were evaluated. Based on the Aggrescan values, sequences such as *Sorex araneus* (–15.7 Na4vSS), *Bos mutus* (–15.2), *Bison bison* (–15.2), *Odobenus rosmarus* (–14.1), and *Ovis aries* (–13.7) showed the lowest aggregation values (Table S2 in Supplementary Material). The analysis of 240 sequences showed 61 with low aggregation propensity and 173 with a higher trend compared to hIAPP. Indeed, hIAPP is situated in a midpoint among sequences (Figure 1C). With the use of algorithms such as PASTA 2.0 and Zygaggregator, similar results were obtained. Importantly, through the evaluation of sequences, we found 113 different residue variants in comparison to hIAPP (Table 1). In regions 17–31 of IAPP, 60% of the substitutions were concentrated, and the replacement of each of the 113 variants in their respective position on the hIAPP sequence was characterized (Figure 2A).

Using as a reference the value of hIAPP (–5.6), 43% of sequences decreased the tendency to aggregate, which could modify the nucleation phenomenon in IAPP monomers.

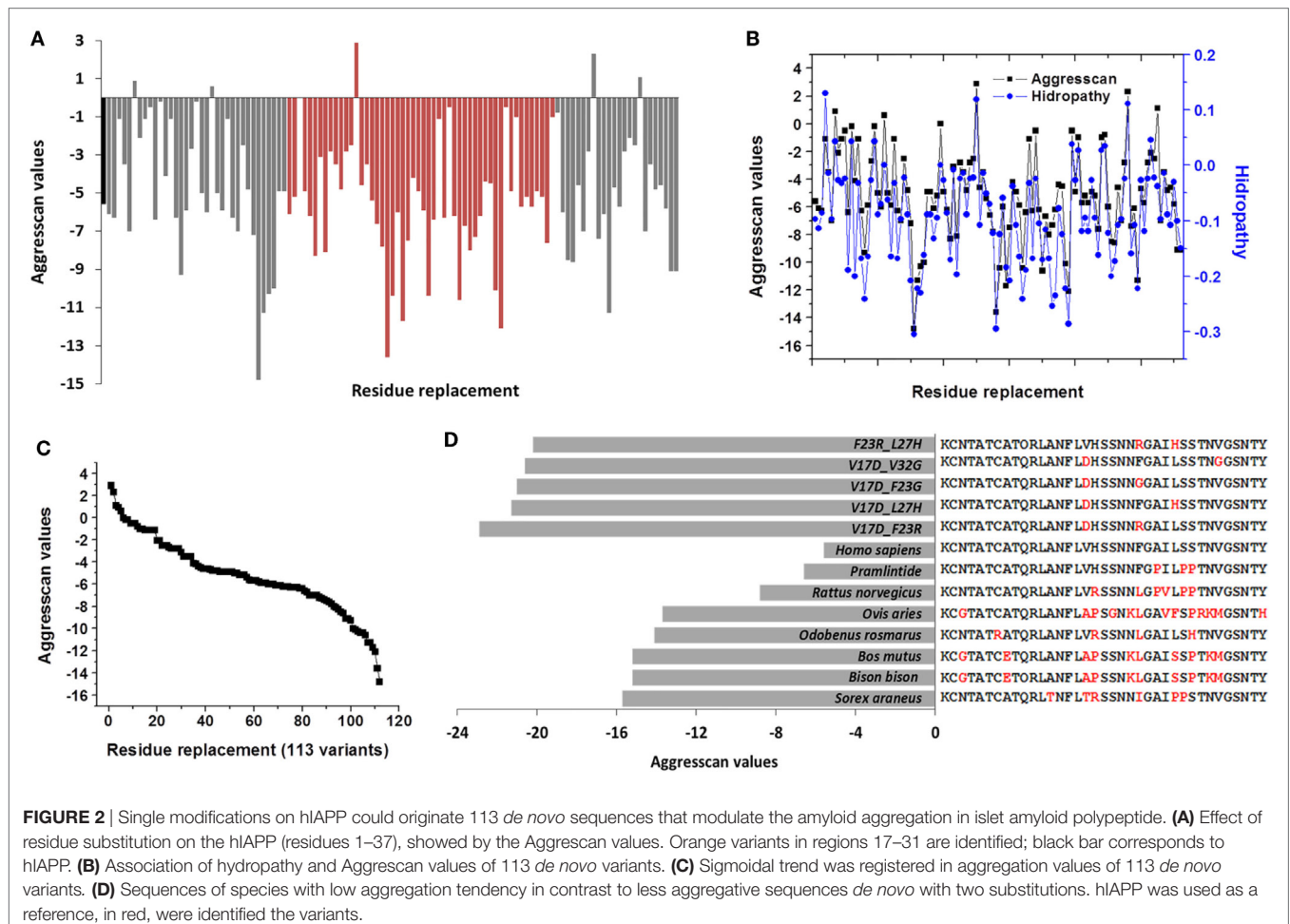


**FIGURE 1** | Analysis of primary structure of islet amyloid polypeptide (IAPP) among 240 species. **(A)** Evaluation of multiple alignments of 240 sequences showing the conserved sites (24). **(B)** Analysis of correlation among Aggrescan and hidropathy values of sequences. **(C)** Distribution of Aggrescan values throughout 240 sequences of IAPP. Negative values were associated with lower aggregation propensity, and positive values with higher aggregation propensity. In black line is identified the sequence of hIAPP.

**TABLE 1** | Primary structure of hIAPP placed in order position, showing the different variants that were originated from the comparison among 240 sequences, the frequency of each variant is shown.

Position	Amino acid	Variants							Residue variants	Total of sequences with the specific variants	
1	K	K <sub>1</sub> R	K <sub>1</sub> E	K <sub>1</sub> I					3	10	
2	C								0	0	
3	N	N <sub>3</sub> G	N <sub>3</sub> D						2	15	
4	T	T <sub>4</sub> I	T <sub>4</sub> M						2	6	
5	A	A <sub>5</sub> V	A <sub>5</sub> I	A <sub>5</sub> P					3	7	
6	T	T <sub>6</sub> I							1	1	
7	C	C <sub>7</sub> Y							1	1	
8	A	A <sub>8</sub> V	A <sub>8</sub> S	A <sub>8</sub> E	A <sub>8</sub> T				4	168	
9	T	T <sub>9</sub> M	T <sub>9</sub> I						2	12	
10	Q	Q <sub>10</sub> H							1	5	
11	R	R <sub>11</sub> E	R <sub>11</sub> W	R <sub>11</sub> H					3	5	
12	L								0	0	
13	A	A <sub>13</sub> T	A <sub>13</sub> V	A <sub>13</sub> S					3	16	
14	N	N <sub>14</sub> D	N <sub>14</sub> T	N <sub>14</sub> H					3	153	
15	F	F <sub>15</sub> Y							1	1	
16	L								0	0	
17	V	V <sub>17</sub> D	V <sub>17</sub> G	V <sub>17</sub> T	V <sub>17</sub> A	V <sub>17</sub> I	V <sub>17</sub> S		6	34	
18	H	H <sub>18</sub> R							1	209	
19	S	S <sub>19</sub> T	S <sub>19</sub> F	S <sub>19</sub> A					3	4	
20	S	S <sub>20</sub> G	S <sub>20</sub> N	S <sub>20</sub> C	S <sub>20</sub> R				4	28	
21	N	N <sub>21</sub> S	N <sub>21</sub> G	N <sub>21</sub> H					3	43	
22	N	N <sub>22</sub> S	N <sub>22</sub> T	N <sub>22</sub> I	N <sub>22</sub> K	N <sub>22</sub> G			5	66	
23	F	F <sub>23</sub> I	F <sub>23</sub> L	F <sub>23</sub> M	F <sub>23</sub> R	F <sub>23</sub> A	F <sub>23</sub> V	F <sub>23</sub> G	7	206	
24	G	G <sub>24</sub> R	G <sub>24</sub> A	G <sub>24</sub> S					3	4	
25	A	A <sub>25</sub> T	A <sub>25</sub> D	A <sub>25</sub> P	A <sub>25</sub> V	A <sub>25</sub> S	A <sub>25</sub> I		6	52	
26	I	I <sub>26</sub> V	I <sub>26</sub> A	I <sub>26</sub> L	I <sub>26</sub> M	I <sub>26</sub> Y			5	74	
27	L	L <sub>27</sub> Y	L <sub>27</sub> I	L <sub>27</sub> F	L <sub>27</sub> S	L <sub>27</sub> H	L <sub>27</sub> X		6	166	
28	S	S <sub>28</sub> V	S <sub>28</sub> A	S <sub>28</sub> L	S <sub>28</sub> P	S <sub>28</sub> T			5	53	
29	S	S <sub>29</sub> P	S <sub>29</sub> A	S <sub>29</sub> T	S <sub>29</sub> H	S <sub>29</sub> L			5	211	
30	T	T <sub>30</sub> V	T <sub>30</sub> P	T <sub>30</sub> R	T <sub>30</sub> N				4	5	
31	N	N <sub>31</sub> K	N <sub>31</sub> D	N <sub>31</sub> S	N <sub>31</sub> V				4	32	
32	V	V <sub>32</sub> M	V <sub>32</sub> L	V <sub>32</sub> G					3	10	
33	G	G <sub>33</sub> S							1	1	
34	S	S <sub>34</sub> A	S <sub>34</sub> P						2	4	
35	N	N <sub>35</sub> S	N <sub>35</sub> A	N <sub>35</sub> T	N <sub>35</sub> Y	N <sub>35</sub> D	N <sub>35</sub> G	N <sub>35</sub> H	N <sub>35</sub> K	8	30
36	T	T <sub>36</sub> A	T <sub>36</sub> S							2	5
37	Y	Y <sub>37</sub> H								1	3

The amino acids of the hIAPP sequence are shown in gray shades.



Similarly, when Aggrescan and hydropathy values were evaluated together, a correlation value of 0.87 (Pearson) was found (**Figure 2B**); in other physicochemical parameters, there was not a significant association. Aggrescan analysis in 113 new sequences suggests a sigmoidal behavior (**Figure 2C**), where most of the sequences could be situated in potential intermediate transition states of aggregation. For instance, in 15 sequences with less aggregation, variants such as V<sub>17</sub>D, F<sub>23</sub>R, F<sub>23</sub>G, and I<sub>26</sub>A could delete any of the *hot spots* (**Table 2**). In general, when positions 17, 23, 25, 26, and 32 in hIAPP were modified, the tendency to aggregation was reduced.

### Proposal of *De Novo* Sequences

Pramlintide is administered in diabetes therapeutic and considered a non-aggregating peptide based on rat IAPP (rIAPP) (32); however, this *de novo* design could not represent the best strategy. In the analysis of the sequence of pramlintide with three substitutions, a value of  $-6.6$  (Na4vSS) was registered, and the rIAPP sequence presents  $-8.8$ . Moreover, incubation of equimolar concentrations of rIAPP and hIAPP leads to a deposition of rIAPP onto amyloid fibrils of hIAPP (33). This may have a significant relevance in the efficacy of pramlintide, suggesting the possibility of new optimized sequences.

Considering the panel of 113 *de novo* variants, 30 of these show less aggregation propensity than pramlintide, with a single residue substitution on hIAPP sequence. Otherwise, taking into account these variants (**Table 2**) and performing the replacement of two residues on the sequence of hIAPP could generate about 95 sequences with lower aggregation index.

Compared to *Homo sapiens*, sequences such as *Sorex araneus* (Aggrescan  $-15.7$ ) with 6 variants, *Bos mutus* ( $-15.2$ ) with 10, and *Odobenus rosmarus* ( $-14.1$ ) with 4 variants had the least tendency to aggregation (Table S2 in Supplementary Material). Contrasting significantly with *de novo* sequences with only two substitutions, such as V<sub>17</sub>D\_F<sub>23</sub>R (Aggrescan  $-22.9$ ), V<sub>17</sub>D\_L<sub>27</sub>H ( $-21.3$ ), V<sub>17</sub>D\_F<sub>23</sub>G ( $-21$ ), V<sub>17</sub>D\_V<sub>32</sub>G ( $-20.6$ ), or F<sub>23</sub>R\_L<sub>37</sub>H ( $-20.2$ ). Even more, variants V<sub>17</sub>D\_F<sub>23</sub>R and V<sub>17</sub>D\_F<sub>23</sub>G could delete *hot spots* (**Figure 2D**). In this sense, modifications that are close to positions 17 and 23 of IAPP showed a lower aggregation propensity. Replacements by polar residues such as Asp and Arg were the most effective to reduce aggregation. Indeed, in the evaluation of sequences with three variants in the sequence of hIAPP data contrast significantly with pramlintide and rat values, obtaining 644 new sequences less prone to aggregation (data not shown).

**TABLE 2** | Effect of substitutions of individual variants on human amylin sequence.

Variant	Sequence	Na4VSS	Hidroph.	PASTA	Organisms
V <sub>17</sub> D	KCNTATCATQRLANFLD <h>SSNNFGA</h> ILSSTNVGSNTY	-14.8	-0.31	-3.46	<i>S. crofa</i>
F <sub>23</sub> R	KCNTATCATQRLANFLV <h>SSNNRGA</h> ILSSTNVGSNTY	-13.6	-0.30	-3.88	<i>C. auratus</i>
L <sub>27</sub> H	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>GA</h> ILSSTNVGSNTY	-12.1	-0.29	-4.10	<i>L. chalumnae</i>
F <sub>23</sub> G	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-11.7	-0.18	-3.88	<i>P. cristatus</i>
V <sub>32</sub> G	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-11.3	-0.22	-4.21	<i>P. cristatus</i>
V <sub>17</sub> G	KCNTATCATQRLANFL <h>G</h> SSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-11.3	-0.22	-3.46	<i>A. nancymaae</i> , <i>B. regulorum</i> , <i>S. boliviensis</i>
I <sub>26</sub> A	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-10.6	-0.17	-3.88	<i>C. cristata</i> , <i>C. porcellus</i> , <i>F. damarensis</i>
A <sub>25</sub> D	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> ILSSTNVGSNTY	-10.4	-0.24	-3.95	<i>C. cristata</i>
F <sub>23</sub> A	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-10.4	-0.12	-3.88	<i>G. fortis</i> , <i>Z. albicollis</i> ,
V <sub>17</sub> T	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-10.3	-0.23	-3.46	<i>C. harengus</i> , <i>E. lucius</i> , <i>S. araneus</i>
L <sub>27</sub> S	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-10.1	-0.22	-6.19	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>C. cristata</i> , <i>P. cristatus</i>
V <sub>17</sub> A	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-10.0	-0.16	-3.46	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>B. taurus</i> , <i>B. bubalis</i>
A <sub>8</sub> E	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-9.3	-0.24	-4.94	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>B. taurus</i>
Y <sub>37</sub> H	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-9.1	-0.15	-4.94	<i>C. hircus</i> , <i>O. aries</i>
T <sub>36</sub> S	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-9.1	-0.10	-4.94	<i>O. princeps</i> , <i>O. cuniculus</i>
<i>H. sapiens</i>	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-5.6	-0.10	-4.94	
K <sub>11</sub> I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-1.1	0.13	-4.94	<i>P. hamadryas</i> ,
S <sub>29</sub> L	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-1.0	0.03	-6.36	<i>P. alecto</i> <i>lq</i>
S <sub>28</sub> L	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-1.0	0.03	-6.36	<i>C. porcellus</i> , <i>F. damarensis</i> , <i>H. glaber</i>
T <sub>30</sub> V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-0.8	0.04	-6.86	<i>O. princeps</i>
S <sub>28</sub> V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-0.5	0.04	-7.61	<i>A. limnaeus</i> , <i>C. variegatus</i> , <i>F. heteroclitus</i>
A <sub>25</sub> I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-0.5	-0.02	-7.41	<i>P. cristatus</i>
A <sub>5</sub> I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-0.5	-0.02	-4.94	<i>O. princeps</i>
T <sub>9</sub> I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-0.2	0.04	-4.94	<i>C. cristata</i> , <i>F. damarensis</i> , <i>H. glaber</i>
T <sub>6</sub> I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	-0.2	0.04	-4.94	<i>A. nancymaae</i>
S <sub>19</sub> F	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	0.0	0.00	-6.50	<i>C. cristata</i>
R <sub>11</sub> W	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	0.6	0.00	-5.84	<i>P. alecto</i> <i>lq</i>
T <sub>4</sub> I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	0.9	0.04	-4.94	<i>A. nancymaae</i>
N <sub>35</sub> Y	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	1.1	-0.04	-4.94	<i>L. chalumnae</i> , <i>P. gutturalis</i>
N <sub>31</sub> V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	2.3	0.11	-6.97	<i>P. cristatus</i>
N <sub>22</sub> I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNF <h>G</h> AILSSSTNVGSNTY	2.9	0.12	-3.46	<i>P. cristatus</i>

In order, 15 sequences with lower aggregation and 15 with greater aggregation are showed, compared to hIAPP. Hot spots regions are identified in red. Hidroph., hydrophobicity in kilocalorie per mole.

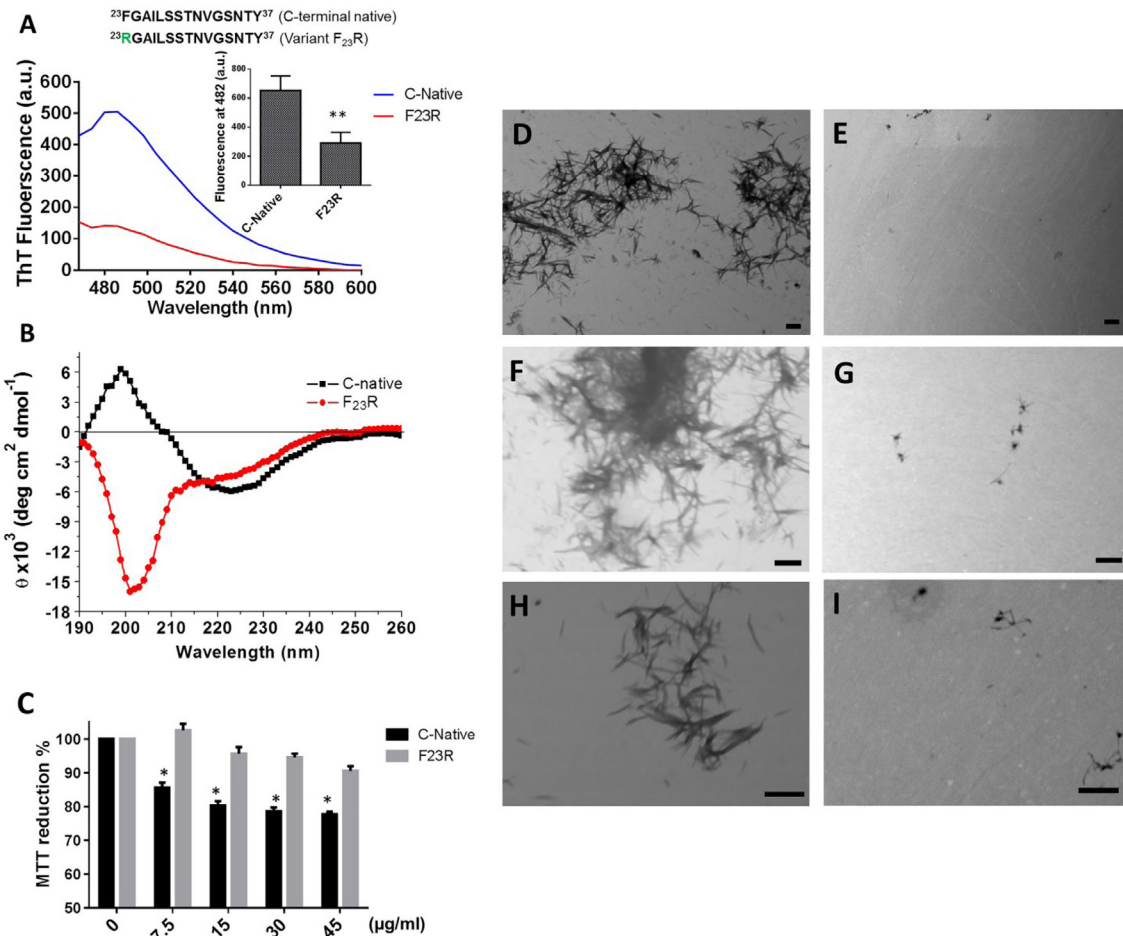
## Modulation of IAPP Folding

Variants that could increase the formation of beta-sheet structures were found in organisms such as *P. cristatus*, *L. chalumnae*, *A. nancymaae*, and *P. alecto*. For instance, only in the evaluation of a group of 15 selected variants, changes that induce a greater propensity to aggregation were N<sub>22</sub>I (2.9 Na4vSS), N<sub>31</sub>V (2.3), N<sub>35</sub>Y (1.1), T<sub>4</sub>I (0.9), and R<sub>11</sub>W (0.6), broadening hot spots in hIAPP (Table 2). These clusters have been associated with atomic structures of the spine of amyloid fibrils made up of beta-sheets with interdigitating side chains, denominated steric zippers (34). Variants in the regions 21–28, 24–33, and 32–37 could increase the tendency to aggregation (Table 2), and substitutions at positions 11, 21, and 28 were the most relevant to induce amyloid aggregation, as well as changes for Ile, Val, Tyr, and Trp, generating long and more hydrophobic hot spots.

To evaluate the proposal of subtle modifications in the native C-terminal domain of hIAPP could reduce the aggregation propensity and modulate the deleterious effects of beta-sheet formation, the domain that intrinsically showed the highest aggregation tendency was characterized (residues 23–37) using the variant F<sub>23</sub>R as a peptide reference (Figure 3A). Considering its location in the aggregation core and that it was one of the variants that may induce a lower aggregation propensity (Table 2). Native C-terminal, intrinsically showed a high tendency to formation

of beta-sheet structures with the characteristic emission ThT-fluorescence spectrum peak at 494 nm, consistent with previous reports (35). However, in the case of the F<sub>23</sub>R variant, there was a significant reduction in the formation of this type of structures (Figure 3A). Complementary experiments through characterization of CD confirmed these results. Characteristic peaks at 201 and 221 nm were associated with the presence of beta-sheet structures only at the native C-terminal (Figure 3B). In addition, when the fragment corresponding to the N-terminal domain (residues 1–17) was characterized, significant changes were not found during the structural evaluation through ThT-fluorescence and CD, keeping the sequence a disordered structure (data not shown).

Extracellular accumulation of hIAPP is one of the conditions that trigger the pathophysiological phenomena associated with DM2 (36), such as diminution in the cell mass of Langerhans islets. Therefore, employing a beta cell model (RIN-m5F), increasing concentrations of peptide fragments were evaluated with the MTT assay. Only the C-native fragment showed conditions of cytotoxicity since the lowest concentration evaluated (7.5 µg/mL) (Figure 3C). Considering the low percentages of β-secondary structures associated to F<sub>23</sub>R, minimum levels of cytotoxicity were registered. In addition, when peptide samples were processed by scanning transmission electronic microscopy, we found



**FIGURE 3** | The  $F_{23}R$  variant modulates beta-sheet formation in C-terminal 23–37 islet amyloid polypeptide domain. **(A)** Emission values obtained with ThT-fluorescence assay, the peak was recorded at 482 nm. **(B)** Circular dichroism spectra of the variants. **(C)** Cell viability evaluated through MTT assay in RIN-m5F cells under increasing concentrations of peptides. Mean values were presented ( $n = 6$ ,  $X \pm SD$ ) \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.005$ . Peptide samples processed by transmission electron microscopy of C-terminal (**D,F,H**) and  $F_{23}R$  variant (**E,G,I**). Bars correspond to 500 nm.

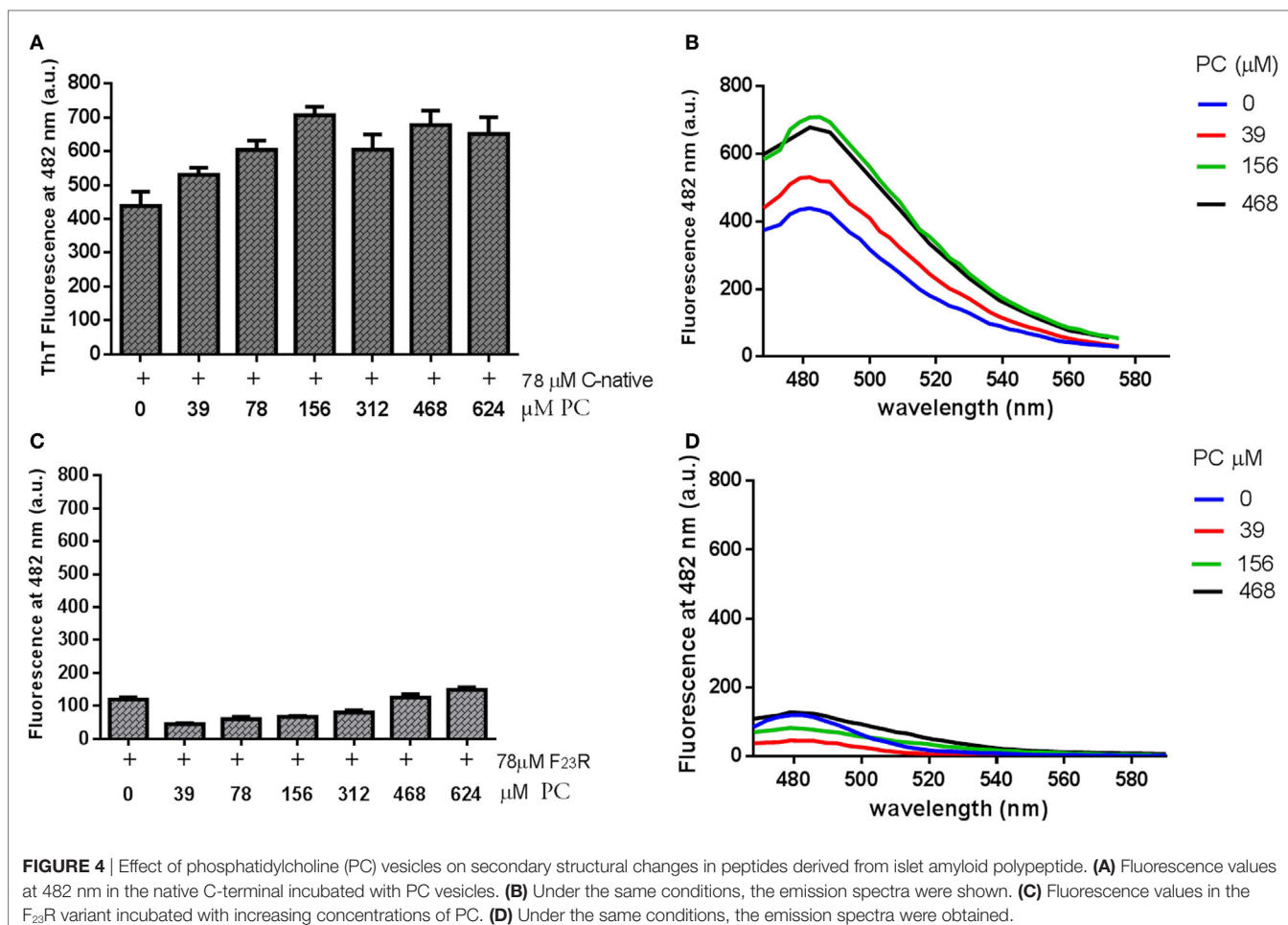
amyloid-like fibrils only in C-native (**Figures 3D,F,H**) under the same experimental conditions in  $F_{23}R$  samples, the amount of amyloid fibrils was low (**Figures 3E,G,I**). In this sense, localized changes in secondary structure of peptides and proteins explain the activation of the function or, in some cases, misfolding protein phenomena, which could be dependent of the lipid microenvironment (4, 18). We have characterized these conditions in proteins that show lipid-binding properties and proposed that lipid–protein interactions were critical in conformational changes that lead to misfolding phenomenon (37). In this sense, a lipid microenvironment-dependence on the structure of IAPP sequences was evaluated (**Figure 4**).

## Effect of Lipid Environment on Secondary Structure

C-terminal and  $F_{23}R$  peptides were incubated with neutral small unilamellar vesicles composed of PC. The presence of conformational transition toward the formation of beta-sheet

structures was found in the native C-terminal from the lowest concentration of PC, specifically in the peptide–lipid 78/39  $\mu M$  relationship (**Figures 4A,B**), which is close to the critical micelle concentration of PC. This phenomenon did not occur when the variant  $F_{23}R$  was evaluated (**Figures 4C,D**). These findings may be associated with the low stability of the C-native sequence and its high propensity of aggregation. Considering that the membrane environment may enhance aggregation, and subtle changes such as the  $F_{23}R$  in the domain of greater aggregation could avoid this phenomenon. Additionally, the characterization was extended to vesicles in which the electrostatic charge on the surface was modulated finding that peptide–lipid interactions that trigger amyloid formation were primarily dependent on the negative charge of lipid surfaces (personal communication).

Complementarily, a dependence of the lipid environment was observed only in the native C-domain in the peptide-bond conformation (**Figure 5A**). Confirmed with the birefringence changes evaluated with Congo-red spectroscopy (**Figure 5B**) indicating the presence of beta-sheet structures dependent on



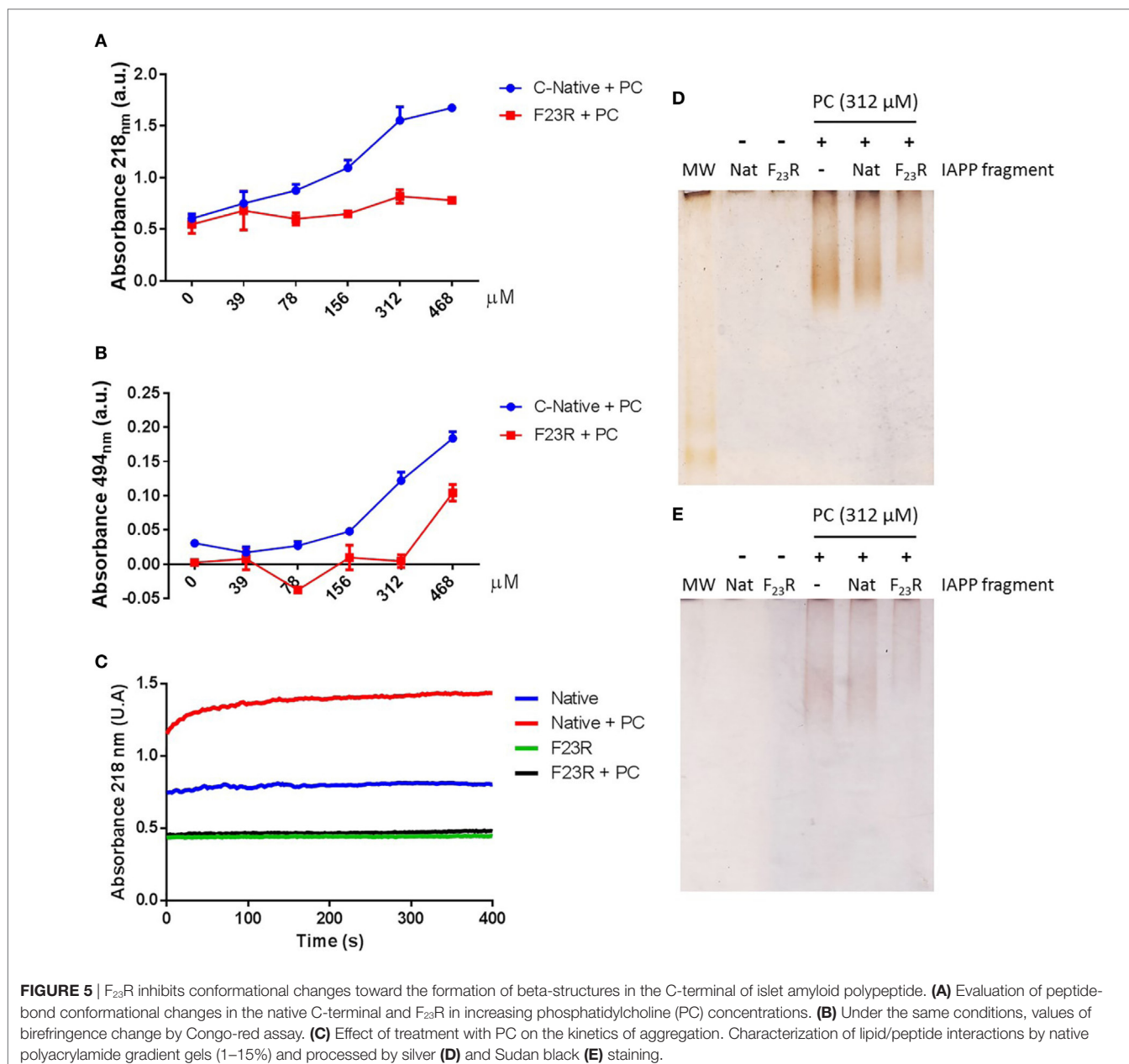
PC. Likewise, this condition was confirmed by monitoring the aggregation kinetics, reflecting the same behavior in the characterization of the peptide bond, in turn, related to an increase in the content of beta-sheet structures in the native C-domain (Figure 5C). However, these changes were not observed when the F<sub>23</sub>R variant was evaluated. Through a standardized assay developed in our group that evaluates lipid-peptide interactions (28, 37), samples were processed through native polyacrylamide gradient gels, which evidenced the native interaction among PC vesicles with the C-terminal peptide, a condition that decreased in the F<sub>23</sub>R variant (Figures 5D,E).

Indeed, F<sub>23</sub>R and the C-terminal did not change substantially with respect to the average hydrophobicity. However, when parameters such as the Aggrescan values were considered, the native C-domain showed a value of 6.6, but the F<sub>23</sub>R variant was -5.3, suggesting a very low tendency to aggregation. This condition determined by electrostatic charges of side chains may explain the high aggregation propensity in C-domain. For instance, the C-terminal at pH range of 3.0–8.5 showed a net charge of 0 with an intrinsic tendency to aggregation, which has already been widely discussed in several reports as a critical problem in the therapeutics of IAPP (38). However, under this same range, the charge of the variant F<sub>23</sub>R was around +1. A subtle balance

among the highly dynamic secondary structure of the C-terminal domain of IAPP, the net charge, and the physicochemical properties of the surrounding lipid microenvironment could define the type of secondary structure acquired.

### Inhibitory Mechanism of the F<sub>23</sub>R Variant on the C-Terminal hIAPP Aggregation

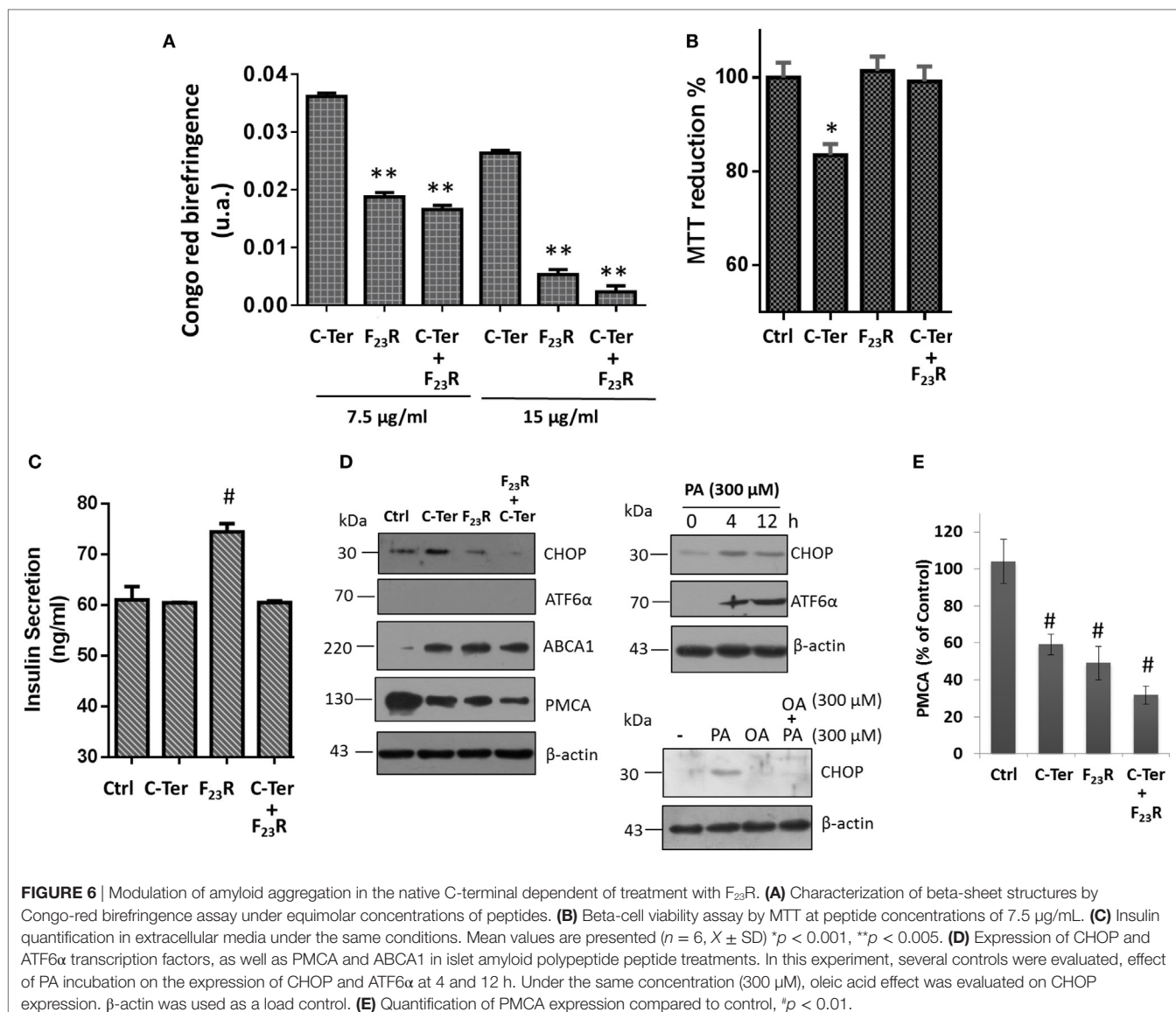
Taking into consideration that the C-terminal may represent a template structure for pramlintide aggregation or other amyloid-like sequences, experimentation was performed to evaluate the interaction between the C-terminal and F<sub>23</sub>R under equimolar concentrations. Results suggest that the variant F<sub>23</sub>R can inhibit amyloid aggregation in the C-terminal, characterized by the change of birefringence with Congo-red (Figure 6A) and ThT-fluorescence (data not shown). Importantly, when cell viability was evaluated, F<sub>23</sub>R did not induce cytotoxic effects in beta cells and avoided cytotoxicity exerted by the native C-terminal (Figure 6B). Insulin secretion was quantified to characterize the physiological function. Although the C-terminal induced a decrease of approximately 20% in cell viability, it did not alter insulin release. Surprisingly, the F<sub>23</sub>R variant promoted an increase of 28% on secreted insulin levels (Figure 6C). These data



suggest that F<sub>23</sub>R could stimulate the optimal function of beta cells. We have shown that amyloid aggregation is a phenomenon that induced the activation of UPR transducers. In this regard, treatment with the C-terminal peptide favored an increase in the expression of CHOP transcription factor dependent of PERK activation, but not ATF6 $\alpha$  activation. An experimental control of ATF6 $\alpha$  expression with tunicamycin was performed, an inhibitor of protein N-glycosylation (Figure S2A in Supplementary Material). The alteration of CHOP did not occur with F<sub>23</sub>R treatment or co-incubation of both peptides (Figure 6D), conditions associated with the protection phenomenon of F<sub>23</sub>R. Likewise, the lipotoxicity induced by the saturated palmitic acid (PA) as a positive control of the UPR activation was characterized (Figure 6D), triggering the expression of CHOP. However, employing another

control condition that possibly does not induce the PERK activation of UPR, oleic acid (OA) treatment did not promote the CHOP expression; moreover, co-incubation of PA and OA avoid the ER stress (Figure 6D). Indeed, in a recently work, we have analyzed the effects main dietary FA have upon pancreatic  $\beta$ -cell metabolism, such as modification in protein homeostasis and intracellular management of lipid metabolism, which in turn have repercussions on insulin  $\beta$ -cell metabolism (39).

Although the mechanism that regulates insulin release has been described extensively through the ATP-sensitive potassium channel, other pathways can also play an important role. Indeed, beta cells express a double system for cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> extrusion: plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA) and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange transport system (40). Therefore, calcium disposal is modulated



by mechanisms highly regulated. In this sense, we found that the C-terminal fragment and F<sub>23</sub>R variant could show an association with a downregulation in PMCA expression (Figures 6D,E), connected with maintaining basal insulin-secretion levels and specifically under treatment with F<sub>23</sub>R allowing an optimized increase. Therefore, IAPP could exert a mechanism in the regulation of cytoplasmic calcium through the modulation of the PMCA expression, and in turn modulate the release of insulin (Figure 6C). However, PMCA overexpression has been associated with ER Ca<sup>2+</sup> depletion, leading to ER-stress in beta cells (41).

The canonical apoptosis pathway due to high levels of CHOP activates the ER oxidoreductin-1 $\alpha$  (ERO-1 $\alpha$ ) generating an increase in ER lumen hyperoxidation. Subsequently, an increase of the IP<sub>3</sub> receptor originate a continuous release of calcium (42). Then, activation of enzymes such as calpain, which could process the proteolytic cleavage of Bcl-2 and PMCA (43). In our experiments, when this possibility was evaluated, degradation

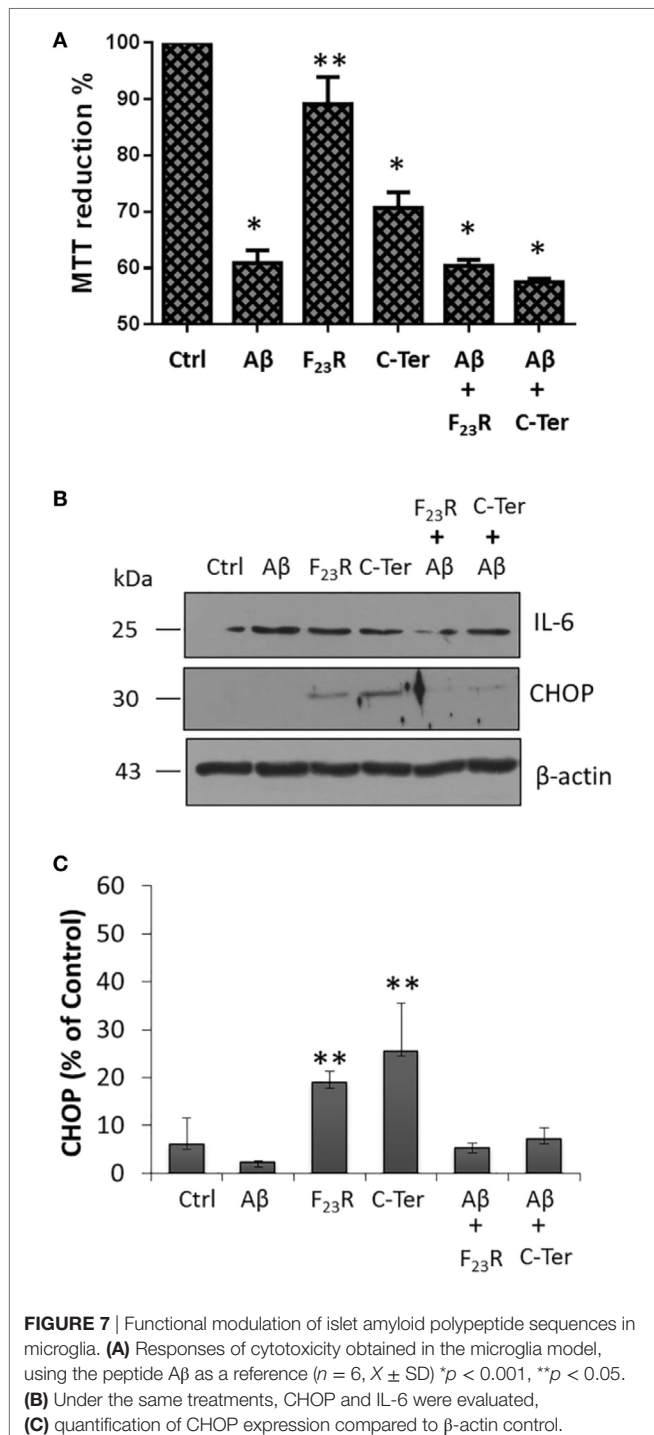
products were not registered in the PMCA characterization, suggesting that regulation is through transcriptional or translational mechanisms. In this sense, expression of PMCA could be mediated by mechanisms associated with the calcineurin/NFAT pathway (43).

In parallel, results suggested that treatment with the C-terminal and F<sub>23</sub>R variant modulate the cholesterol metabolism in beta cells through switching the ABCA1 transporter (Figure 6D). Modulation of the transporter can function as a compensatory mechanism that reduce cholesterol levels in cytoplasmic membrane to ameliorate the amyloid damage of IAPP, considering that cholesterol has been described as a promoter of fibril formation in hIAPP (44). Moreover, accumulation of cholesterol due to alterations in ABCA1 has been linked to impaired exocytosis of insulin granules (45). Therefore, the increase in ABCA1 could be associated with a mechanism to maintain basic functions such as insulin secretion in close connection with the regulation of

PMCA expression. Taken together, this could be a novel response in beta cells to keep their basal functions.

Additionally, we evaluated the possibility of protection mechanisms employing the F<sub>23</sub>R sequence in other cellular models that are physiologically exposed to amyloid fibrils. Using A $\beta$ -peptide as a reference amyloid, a drastic decrease in cell viability of microglia was registered, a phenomenon that was also present in C-terminal treatment (Figure 7A). Importantly, F<sub>23</sub>R treatment did not affect the viability of microglia. It should be noted that

unlike Langerhans beta cells, equimolar treatment with F<sub>23</sub>R was not able to avoid damage of amyloid structures, considering that microglia is a sensitive model for proteostasis disruption. However, treatments with F<sub>23</sub>R induced a lower synthesis of the pro-inflammatory cytokine IL-6 (Figure 7B). CHOP is a transcription factor that regulates the expression of chaperones and redox enzymes; however, under chronic overactivation of ER stress, CHOP triggers apoptosis (2). Under our 12-h treatment in microglia, the activation of CHOP by IAPP could be associated with protective phenomena (Figures 7B,C).



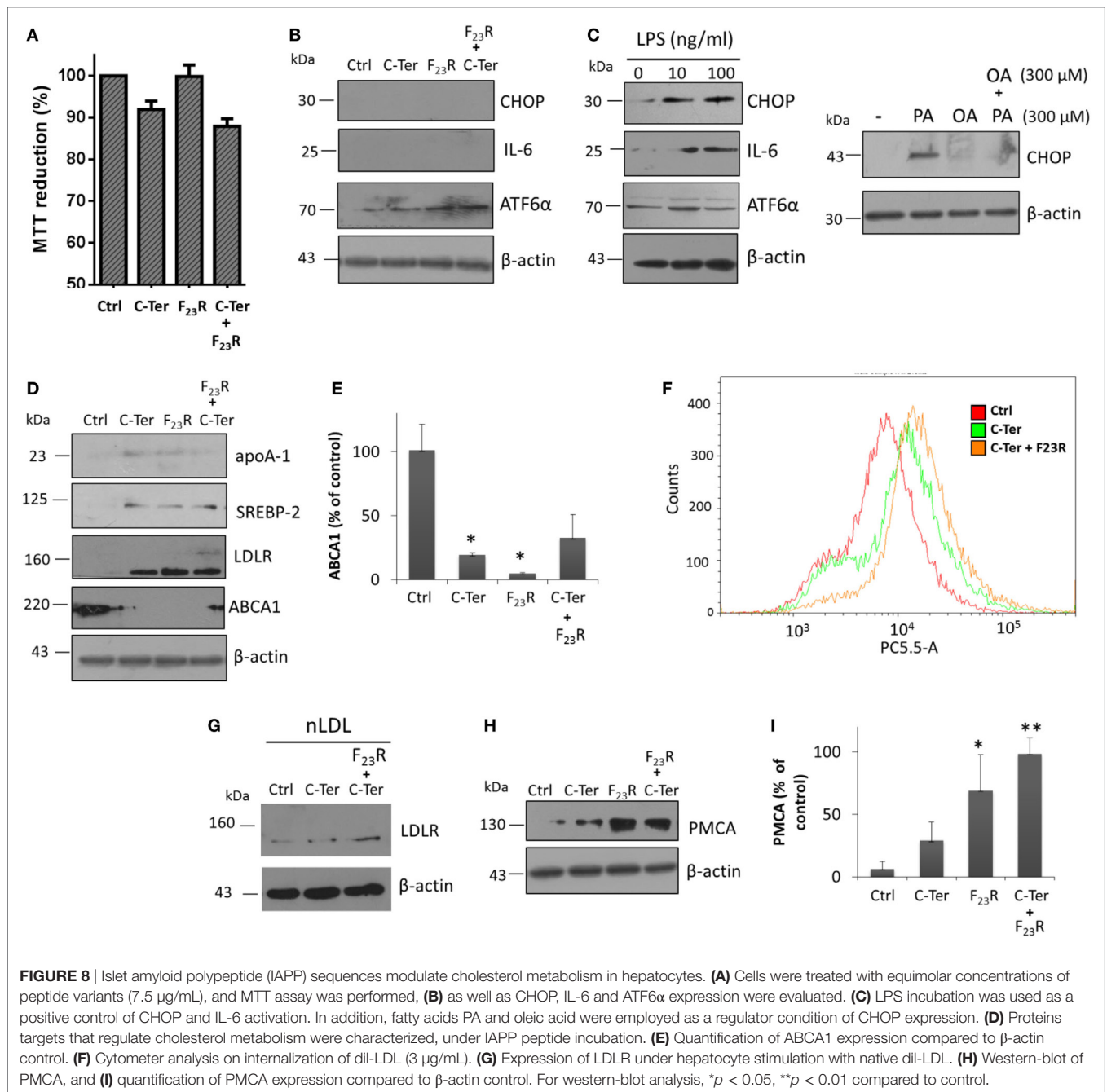
**FIGURE 7** | Functional modulation of islet amyloid polypeptide sequences in microglia. **(A)** Responses of cytotoxicity obtained in the microglia model, using the peptide A $\beta$  as a reference ( $n = 6$ ,  $X \pm SD$ ) \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.05$ . **(B)** Under the same treatments, CHOP and IL-6 were evaluated, **(C)** quantification of CHOP expression compared to  $\beta$ -actin control.

## Regulation of Cholesterol Metabolism in Hepatocytes

Hepatocytes that intrinsically express low levels of CHOP were evaluated. Using the same panel of peptide treatments, no response was found in the activation of CHOP, and IL-6 synthesis was not even registered. Instead, ATF6 $\alpha$  was activated, which was associated with minimal modification of cell viability (Figures 8A,B). Specifically, in order to show positive controls, ER stress inducer molecules were evaluated, tunicamycin and palmitic acid (Figures S2B,C in Supplementary Material), which activated in an important way the PERK pathway. Therefore, the IAPP fragments did not induce severe ER stress conditions. In addition, an inflammatory condition induced by Gram-negative endotoxins was evaluated; in this case, LPS promoted the expression of CHOP and pro-inflammatory IL-6 (Figure 8C). Also, similar to characterization of beta cells, PA-lipotoxicity induced CHOP activation; however monounsaturated OA under the same concentration did not promote this phenomenon, moreover avoided the PA effect (Figure 8C).

Characterization of several targets involved in cholesterol metabolism was performed regardless of the IAPP variants evaluated. Peptide treatment modulated cholesterol metabolism through activation of transcriptional factors that regulate expression of key targets of cholesterol metabolism such as SREBP-2. This mechanism is activated *via* COPII vesicles for the transport from ER to the Golgi apparatus similar to ATF6 $\alpha$ , thus, there could be a shared activation mechanism. In turn, this phenomenon was associated with increased expression of the LDLR (Figure 8D). Therefore, in order to evaluate the endocytic capacity, hepatocyte cultures were stimulated with dil-LDL. Results suggested that C-terminal treatment, and F<sub>23</sub>R/C-terminal induced an increase of dil-LDL internalization (Figure 8F), and under these conditions confirmed by a trigger on LDLR levels (Figure 8G).

Likewise, these conditions promoted the expression of apoA-1, the major protein component of atheroprotective high-density lipoproteins. Importantly, there was a decrease in the expression of the ABCA1 transporter (Figures 8D,E). In contrast to beta cells, cholesterol maintenance in hepatocytes was associated with an increase in PMCA levels (Figures 8H,I), which induced a differential regulation of cytoplasmic calcium in connection with cholesterol metabolism. In general, these results suggest that IAPP regulates through C-terminal domain the management of hepatic cholesterol by the activation of mechanisms that favor an increase in cellular levels. Therefore, this metabolic modulation could be associated with IAPP-mediated atheroprotective functions. In this sense, one of the control mechanisms in expression of these



targets may be owing to the function of long non-coding RNAs such as DYNLRB2-2:1, LeXis, or APOA1-AS (46–48), which we are currently studying.

## DISCUSSION

Considering that peptide folding is triggered mainly by hydrophobic interactions, electrostatic properties at the polar/non-polar interface of the lipid/protein vesicles could play a key role in the transition and stabilization of IAPP segments (4). Associated with the formation of amyloid-like fibrils, specifically with the function

and stability of the C-terminal domain of greater aggregation in IAPP. Otherwise, the incubation of the new F<sub>23</sub>R variant with the native C-terminal could modulate the conformational rearrangements and reduce the processes of amyloid fibril formation. This represents a strategic point for the improved amylinomimetic design, and, in consequence, for metabolic management.

New approaches to understand the sequences prone to aggregation and modulation of the formation of toxic-aggregate structures must be aimed at acquiring knowledge about the behavior of IAPP in different species. The generation of stable IAPP analogs may represent an optimized treatment for the regulation of

glucose metabolism, and as we have documented in this paper, in the cholesterol metabolism. A biology-based strategy can provide a comprehensive solution to design-optimized sequences based on IAPP, increasing the alternative of treatments.

Alterations of cholesterol metabolism may contribute to the impairment of beta cell function (49). Our data suggest that the C-terminal and, specifically, the F<sub>23</sub>R variant could decrease cholesterol levels in the membrane through ABCA1. In contrast, results in the hepatocytes model suggest the presence of mechanisms that allow the accumulation of cholesterol by increased expression of the main HDL protein, apoA-1, activation of factor SREBP2, and LDLR activity. It is highly possible that tissue-specific regulation by IAPP is present. Currently, the role of IAPP in cholesterol metabolism has not been elucidated. For instance, one study conducted in rats, which subcutaneous administration of IAPP changes the proportion of trihydroxy and dihydroxycholates in the secretion of bile, improving the processes of conjugation and hydroxylation in hepatocytes (50). In addition, although it has been reported that pramlintide treatment reduced circulating triglycerides in DM2 patients, significant differences in blood pressure, HDL, and LDL cholesterol has not been found (50).

The F<sub>23</sub>R variant is an important proposal considering that induces a conformational rearrangement in the IAPP C-terminal reducing fibril formation processes, which is a strategic point for amylinomimetic design and, consequently, for the metabolic management. This *de novo* sequence with only one substitution could represent an optimized treatment, with a reduction in adverse effects due to immunologic activation. Although, previous studies have proposed more than one substitution of different amino acids in the N- and C-terminal domains of the native sequence of hIAPP (51). In our study evaluating beta cells, the F<sub>23</sub>R showed inhibitory properties of template mechanisms that trigger amyloid fibril formation in the native C-terminal domain. In turn, optimizing key functions such as insulin secretion. Importantly, in hepatocytes, F<sub>23</sub>R induced the metabolic rearrangement through the modulation of cholesterol flow, which could have an impact in reduction of cardiovascular risk, favoring LDL endocytosis.

## REFERENCES

- Lee J, Ozcan U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem* (2014) 289:1203–11. doi:10.1074/jbc.R113.534743
- Diaz-Villanueva JF, Diaz-Molina R, Garcia-Gonzalez V. Protein folding and mechanisms of proteostasis. *Int J Mol Sci* (2015) 16:17193–230. doi:10.3390/ijms160817193
- Mendoza-Espinosa P, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease. *Mol Cell Biochem* (2009) 330:105–20. doi:10.1007/s11010-009-0105-6
- Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J. Amyloidogenic properties of a D/N mutated 12 amino acid fragment of the C-terminal domain of the cholesteryl-ester transfer protein (CETP). *Int J Mol Sci* (2011) 12:2019–35. doi:10.3390/ijms12032019
- Koda JE, Fineman M, Rink TJ, Dailey GE, Muchmore DB, Linares LG. Amylin concentrations and glucose control. *Lancet* (1992) 339:1179–80. doi:10.1016/0140-6736(92)90785-2
- Percy AJ, Trainor DA, Rittenhouse J, Phelps J, Koda JE. Development of sensitive immunoassays to detect amylin and amylin-like peptides in unextracted plasma. *Clin Chem* (1996) 42:576–85.

Our work presents a new approach for the understanding of strategies that modulate the folding in sequences with a high propensity to aggregation through a biomimetic approach. Our data suggest that domains with a high intrinsic propensity to aggregation tend to be protected by diverse strategies to decrease this phenomenon, indicating the existence of evolutionary factors of resistance to aggregation (21). Adaptation and modulation of these phenomena is critical. Therefore, we are currently working in the chemical optimization of the structure of these peptides, which may increase their thermodynamic stability. We are currently on the tip of the iceberg about the possibilities of sequences generated *de novo* as a source of inspiration for the development of therapeutic strategies.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: AP-C, IM-N, and VG-G. Performed experiments: AP-C, IM-N, LG-O, EC-P, and VG-G. Analyzed data: RD-M, JM-O, IR, AP-C, IM-N, and VG-G. Contributed reagents/materials/analysis tools: VG-G. Wrote the paper: AP-C, IM-N, and VG-G.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claudia Gomez Ruiz, Ingrid Mascher and Ana María Guerrero for editorial services. Carmen García-González, Blanca Delgado-Coello, Gustavo Hurtado and Roberto León for technical support. This study was supported by Coordinación de Posgrado e Investigación-Universidad Autónoma de Baja California grant 106/2/N/57/1, and by Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el tipo Superior, Secretaria de Educación Pública grant UABC-PTC-487.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00331/full#supplementary-material>.

- Novials A, Sarri Y, Casamitjana R, Rivera F, Gomis R. Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes* (1993) 42:1514–9. doi:10.2337/diab.42.10.1514
- Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* (2011) 334:1081–6. doi:10.1126/science.1209038
- Cao P, Abedini A, Raleigh DP. Aggregation of islet amyloid polypeptide: from physical chemistry to cell biology. *Curr Opin Struct Biol* (2013) 23:82–9. doi:10.1016/j.sbi.2012.11.003
- Butler PC, Chou J, Carter WB, Wang YN, Bu BH, Chang D, et al. Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes* (1990) 39:752–6. doi:10.2337/diab.39.6.752
- Kautzky-Willer A, Thomaseth K, Ludvik B, Nowotny P, Rabensteiner D, Waldhäusl W, et al. Elevated islet amyloid pancreatic polypeptide and proinsulin in lean gestational diabetes. *Diabetes* (1997) 46:607–14. doi:10.2337/diab.46.4.607
- Poa NR, Cooper GJ, Edgar PF. Amylin gene promoter mutations predispose to type 2 diabetes in New Zealand Maori. *Diabetologia* (2003) 46:574–8. doi:10.1007/s00125-003-1068-x
- Berhanu WM, Hansmann UH. Inter-species cross-seeding: stability and assembly of rat-human amylin aggregates. *PLoS One* (2014) 9:e97051. doi:10.1371/journal.pone.0097051

14. Aleksis R, Oleskovs F, Jaudzems K, Pahnke J, Biverstal H. Structural studies of amyloid-beta peptides: unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie* (2017) 140:176–92. doi:10.1016/j.biochi.2017.07.011
15. Babitha S, Annamalai M, Dykas MM, Saha S, Poddar K, Venugopal JR, et al. Fabrication of a biomimetic Zein/PDA nanofibrous scaffold impregnated with BMP-2 peptide conjugated TiO<sub>2</sub> nanoparticle for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* (2017) 12(4):991–1001. doi:10.1002/term.2563
16. NCBI. IAPP (2017). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=%28%28%28IAPP%20islet%20amyloid%20polypeptide%29%20NOT%20synthetic%29%20NOT%20PREDICTED%29%20NOT%20PARTIAL>
17. Mendoza-Espinosa P, Montalvan-Sorrosos D, García-González V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides. *Mol Cell Biochem* (2014) 393:99–109. doi:10.1007/s11010-014-2050-2
18. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J. Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. *Biochem Biophys Res Commun* (2013) 434:54–9. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.067
19. Conchillo-Solé O, de Groot NS, Avilés FX, Vendrell J, Daura X, Ventura S. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinform* (2007) 8:65. doi:10.1186/1471-2105-8-65
20. Walsh I, Seno F, Tosatto SC, Trovato A. PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic Acids Res* (2014) 42:W301–7. doi:10.1093/nar/gku399
21. Tartaglia GG, Pawar AP, Campioni S, Dobson CM, Chiti F, Vendruscolo M. Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. *J Mol Biol* (2008) 380:425–36. doi:10.1016/j.jmb.2008.05.013
22. Baldi P, Brunak S, Frasconi P, Soda G, Pollastri G. Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* (1999) 15:937–46. doi:10.1093/bioinformatics/15.11.937
23. Maloney C, Sequeira E, Kelly C, Orris R, Beck J. *The NCBI Handbook*. 2nd ed. Bethesda, MD: NCBI (2013).
24. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (2007) 23:2947–8. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
25. Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* (2006) 7:439. doi:10.1186/1471-2105-7-439
26. Klunk WE, Jacob RF, Mason RP. Quantifying amyloid beta-peptide (Aβ) aggregation using the Congo red-Aβ (CR-Aβ) spectrophotometric assay. *Anal Biochem* (1999) 266:66–76. doi:10.1006/abio.1998.2933
27. Benkato K, O'Brien B, Bui MN, Jasinski DL, Guo P, Khisamutdinov EF. Evaluation of thermal stability of RNA nanoparticles by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in native condition. *Methods Mol Biol* (2017) 1632:123–33. doi:10.1007/978-1-4939-7138-1\_8
28. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mas-Oliva J. The C-terminal domain supports a novel function for CETPI as a new plasma lipopolysaccharide-binding protein. *Sci Rep* (2015) 5:16091. doi:10.1038/srep16091
29. Garcia-Gonzalez V, Mas-Oliva J. A novel beta-adaptin/c-Myc complex formation modulated by oxidative stress in the control of the cell cycle in macrophages and its implication in atherogenesis. *Sci Rep* (2017) 7:13442. doi:10.1038/s41598-017-13880-5
30. Jenik M, Parra RG, Radusky LG, Turjanski A, Wolyne PG, Ferreira DU. Protein frustrator: a tool to localize energetic frustration in protein molecules. *Nucleic Acids Res* (2012) 40:W348–51. doi:10.1093/nar/gks447
31. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* (2012) 148:1188–203. doi:10.1016/j.cell.2012.02.022
32. Singh-Franco D, Robles G, Gazze D. Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* (2007) 29:535–62. doi:10.1016/j.clinthera.2007.04.005
33. Wang H, Ridgway Z, Cao P, Ruzsicska B, Raleigh D. Analysis of the ability of pramlintide to inhibit amyloid formation by human islet amyloid polypeptide reveals a balance between optimal recognition and reduced amyloidogenicity. *Biochemistry* (2015) 54:6704–11. doi:10.1021/acs.biochem.5b00567
34. Chandra B, Korn A, Maity BK, Adler J, Rawat A, Krueger M, et al. Stereoisomers probe steric zippers in amyloid-beta. *J Phys Chem B* (2017) 121:1835–42. doi:10.1021/acs.jpcc.6b12332
35. Peccati F, Pantaleone S, Riffet V, Solans-Monfort X, Contreras-García J, Guallar V, et al. Binding of thioflavin T and related probes to polymorphic models of amyloid-beta fibrils. *J Phys Chem B* (2017) 121:8926–34. doi:10.1021/acs.jpcc.7b06675
36. Khemtemourian L, Gazit E, Miranker A. Recent insight in islet amyloid polypeptide morphology, structure, membrane interaction, and toxicity in type 2 diabetes. *J Diabetes Res* (2016) 2016:2535878. doi:10.1155/2016/2535878
37. García-González V, Gutiérrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Piñero A, Mas-Oliva J. Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *J Struct Biol* (2014) 186:19–27. doi:10.1016/j.jsb.2014.02.002
38. Smaoui MR, Waldispühl J. Complete characterization of the mutation landscape reveals the effect on amylin stability and amyloidogenicity. *Proteins* (2015) 83:1014–26. doi:10.1002/prot.24795
39. Acosta-Montano P, Garcia-Gonzalez V. Effects of dietary fatty acids in pancreatic beta cell metabolism, implications in homeostasis. *Nutrients* (2018) 10:ii:E393. doi:10.3390/nu10040393
40. Herchuelz A, Nguidjoe E, Jiang L, Pachera N. Na(+)/Ca(2+) exchange and the plasma membrane Ca(2+)-ATPase in beta-cell function and diabetes. *Adv Exp Med Biol* (2013) 961:385–94. doi:10.1007/978-1-4614-4756-6\_33
41. Jiang L, Allagnat F, Nguidjoe E, Kamagate A, Pachera N, Vanderwinden JM, et al. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase overexpression depletes both mitochondrial and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> stores and triggers apoptosis in insulin-secreting BRIN-BD11 cells. *J Biol Chem* (2010) 285:30634–43. doi:10.1074/jbc.M110.116681
42. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* (2011) 13:184–90. doi:10.1038/ncb0311-184
43. Bruce JIE. Metabolic regulation of the PMCA: role in cell death and survival. *Cell Calcium* (2018) 69:28–36. doi:10.1016/j.ceca.2017.06.001
44. Boczek T, Lisek M, Ferenc B, Zylinska L. Cross talk among PMCA, calcineurin and NFAT transcription factors in control of calmodulin gene expression in differentiating PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* (2017) 1860:502–15. doi:10.1016/j.bbagr.2017.01.012
45. Wijesekara N, Kaur A, Westwell-Roper C, Nackiewicz D, Soukhatcheva G, Hayden MR, et al. ABCA1 deficiency and cellular cholesterol accumulation increases islet amyloidogenesis in mice. *Diabetologia* (2016) 59:1242–6. doi:10.1007/s00125-016-3907-6
46. Hu YW, Yang JY, Ma X, Chen ZP, Hu YR, Zhao JY, et al. A lincRNA-DYNLRB2-2/GPR119/GLP-1R/ABCA1-dependent signal transduction pathway is essential for the regulation of cholesterol homeostasis. *J Lipid Res* (2014) 55:681–97. doi:10.1194/jlr.M044669
47. Tontonoz P, Wu X, Jones M, Zhang Z, Salisbury D, Sallam T. Long noncoding RNA facilitated gene therapy reduces atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia. *Circulation* (2017) 136:776–8. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029002
48. Halley P, Kadakkuzha BM, Faghihi MA, Magistri M, Zeier Z, Khorkova O, et al. Regulation of the apolipoprotein gene cluster by a long noncoding RNA. *Cell Rep* (2014) 6:222–30. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.015
49. Kruit JK, Wijesekara N, Fox JE, Dai XQ, Brunham LR, Searle GJ, et al. Islet cholesterol accumulation due to loss of ABCA1 leads to impaired exocytosis of insulin granules. *Diabetes* (2011) 60:3186–96. doi:10.2337/db11-0081
50. Vasheka IP, Vesel'skiy SP, Horenko ZA, Hrinchenko OA, Karbovs'ka LS, Makarchuk MI. [The influence of amylin on the bile acid spectrum in rats]. *Fiziol Zh* (2014) 60:46–53. doi:10.15407/fz60.03.046
51. Patil SM, Alexandrescu AT. Charge-based inhibitors of amylin fibrillization and toxicity. *J Diabetes Res* (2015) 2015:946037. doi:10.1155/2015/946037

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Pulido-Capiz, Díaz-Molina, Martínez-Navarro, Guevara-Olaya, Casanueva-Pérez, Mas-Oliva, Rivero and García-González. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Review

# Ceramide Metabolism Balance, a Multifaceted Factor in Critical Steps of Breast Cancer Development

Victor García-González \* , José Fernando Díaz-Villanueva, Octavio Galindo-Hernández , Israel Martínez-Navarro, Gustavo Hurtado-Ureta and Abril Alicia Pérez-Arias

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Baja California, Mexico; jdiaz92@uabc.edu.mx (J.F.D.-V.);

octavio.galindo@uabc.edu.mx (O.G.-H.); israel.martinez.navarro@uabc.edu.mx (I.M.-N.);

gustavo.hurtado@uabc.edu.mx (G.H.-U.); abril.alicia.perez.arias@uabc.edu.mx (A.A.P.-A.)

\* Correspondence: vgarcia62@uabc.edu.mx; Tel.: +52-68-6557-1622 (ext. 121); Fax: +52-68-6557-1622 (ext. 109)

Received: 23 July 2018; Accepted: 20 August 2018; Published: 26 August 2018



**Abstract:** Ceramides are key lipids in energetic-metabolic pathways and signaling cascades, modulating critical physiological functions in cells. While synthesis of ceramides is performed in endoplasmic reticulum (ER), which is altered under overnutrition conditions, proteins associated with ceramide metabolism are located on membrane arrangement of mitochondria and ER (MAMs). However, ceramide accumulation in meta-inflammation, condition that associates obesity with a chronic low-grade inflammatory state, favors the deregulation of pathways such as insulin signaling, and induces structural rearrangements on mitochondrial membrane, modifying its permeability and altering the flux of ions and other molecules. Considering the wide biological processes in which sphingolipids are implicated, they have been associated with diseases that present abnormalities in their energetic metabolism, such as breast cancer. In this sense, sphingolipids could modulate various cell features, such as growth, proliferation, survival, senescence, and apoptosis in cancer progression; moreover, ceramide metabolism is associated to chemotherapy resistance, and regulation of metastasis. Cell-cell communication mediated by exosomes and lipoproteins has become relevant in the transport of several sphingolipids. Therefore, in this work we performed a comprehensive analysis of the state of the art about the multifaceted roles of ceramides, specifically the deregulation of ceramide metabolism pathways, being a key factor that could modulate neoplastic processes development. Under specific conditions, sphingolipids perform important functions in several cellular processes, and depending on the preponderant species and cellular and/or tissue status can inhibit or promote the development of metabolic and potentially breast cancer disease.

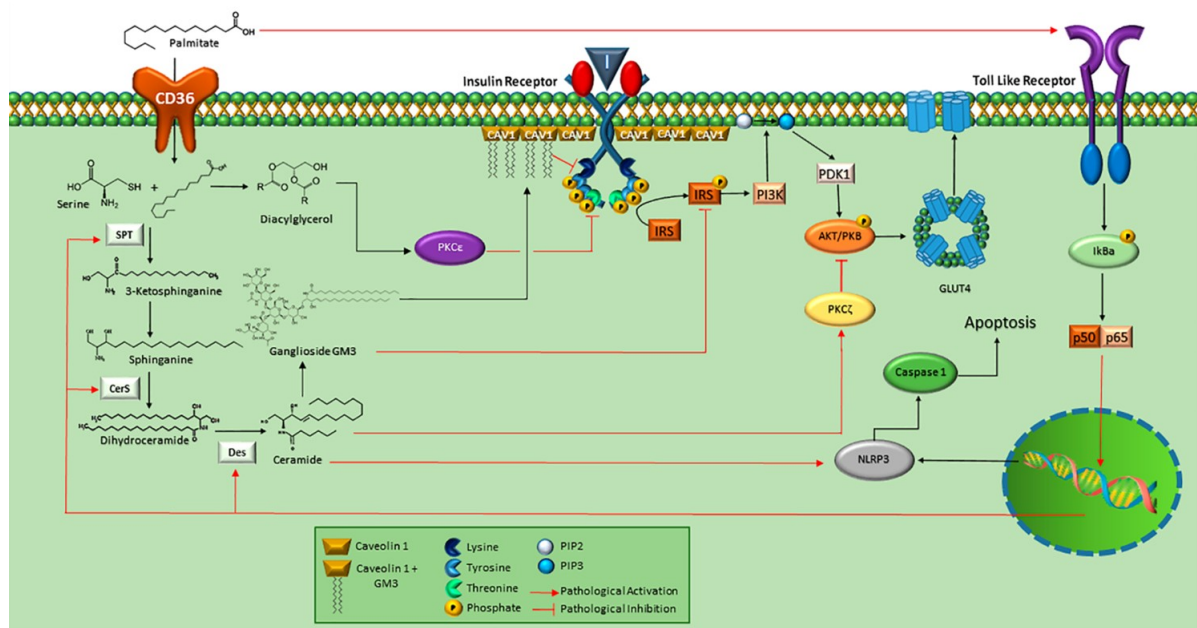
**Keywords:** ceramides; meta-inflammation; breast cancer

## 1. Introduction

A chronic excess of triglycerides in the body, specifically within adipose tissue, can lead to its saturation and promote the release of free fatty acids (FFA) to blood circulation. These lipids could be transported by serum albumin and lipoproteins, promoting their accumulation in tissues such as liver, pancreas, and skeletal muscle, which triggers alterations in several signaling pathways associated with energetic metabolism and cell cycle regulation [1]. Importantly, saturated fatty acids (SFA) have been described as modulators of gene expression targets involved in the metabolism of sphingolipids [2]. For instance, the increase of cytoplasmic palmitoyl-CoA by lipogenesis and cell internalization could drive fatty acids toward ceramides synthesis in endoplasmic reticulum (ER) through the de novo pathway. Therefore, ceramides modify several metabolic pathways generating a cellular imbalance, for example C16 ceramide could block the activity of the electron transport chain (ECT) by inhibition

of complex IV, inducing the generation of reactive oxygen species (ROS) [3]. In addition, an increase in mitochondrial ceramides contributes to the sensitization of the IP3R, favoring the release of  $\text{Ca}^{2+}$  from ER to the mitochondria [4].

Accumulation of triglycerides and intermediate molecules such as ceramides and diacylglycerols (DAGs) are a consequence of chronic overnutrition [5,6]. Therefore, DAGs, ceramides and SFAs induce chronic inflammatory conditions, originating cellular deleterious effects [7]. An increase in the synthesis of C16-ceramides is associated with obesity and development of diabetes mellitus type 2, inhibiting fatty acid oxidation [8] (Figure 1). Cytosolic DAGs are associated with activation of hepatic  $\text{PKC}\epsilon$  [9], which has been demonstrated to phosphorylate the insulin receptor (INSR) in Threonine-1160 leading to inhibition of IRS kinase activity [10]. Thus, activation of hepatic  $\text{PKC}\epsilon$  induced by DAGs in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease has been related to hepatic insulin resistance [9]. In addition, activation of TLR-4 by palmytic acid could trigger a cascade of intracellular signaling mediated by phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ , which induces the activation of p50 and p65, and the expression of serin-palmitoyl acyltransferase (SPT), ceramide synthase (CerS) and dihydroceramide desaturase, key enzymes in the synthesis of ceramides [11]. Likewise, the increase in intracellular ceramides could trigger the activation of NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) [12], complex that integrates the inflammasome. Indeed, inflammasome functions as a putative sensor of ceramides; therefore caspase-1 is activated by this mechanism [13]. Evidence shows a close relationship among the role of ceramides with the development of metabolic pathologies (Figure 1).



**Figure 1.** Metabolic implications associated to ceramide synthesis. Free fatty acid (FFA) such as palmitic acid is internalized through CD36, and ceramide synthesis is stimulated by serin-palmitoyl acyltransferase (SPT) through the addition of serine to produce sphinganine. Then, is converted into dihydroceramide by CerS and finally to ceramide by Des. Ceramides promote inhibition of Akt/PKB signaling by PKC function. Ceramides can be turned to GM3 which inhibits INRS, blocking insulin signaling. GM3 accumulation promotes the dissociation of IR/Cav-1 complex. Likewise, palmitic acid can function as a ligand for TLR-4, activating its signaling cascade that leads to the expression of genes encoding enzymes such as SPT, CerS, and Des. On the other hand, palmitic acid can be metabolized to DAG, which stimulates  $\text{PKC}\epsilon$ , activated  $\text{PKC}\epsilon$  phosphorylates Thr 1160 of INSR, causing its inhibition. Finally, ceramides could activate NLRP3 and lead to apoptosis by Caspase-1-dependent pathway. Image adapted from references: [9–13].

In addition, an increase in the synthesis of ceramides associated with ER stress promotes the flow of lipids among ER and mitochondria through the structures such as mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and multivesicular endosomes (MVEs), moreover these structures are involved in mechanisms such as ceramide synthesis, ATP flux between ER and mitochondria, as well as exosome-secretion [14]. In an important way, exosomes are vesicles that perform key functions in processes of autocrine, paracrine and endocrine communication. Specifically, MVEs are composed of intraluminal vesicles and participate in internalization of macromolecules and vacuolar/lysosomal hydrolase delivery [15]. Once molecules are incorporated in these vesicles, they have two pathways, degradation or secretion as exosomes by fusion with the plasma membrane, a process that is regulated by the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I). Indeed, exosomes have been described to be enriched in ceramides; consequently, exogenous treatment with a sphingomyelinase inhibitor reduced the releasing of exosomes, as well as in the depletion of neutral sphingomyelinase-2, which suggests that ceramide metabolism is implicated in biogenesis of exosomes from intraluminal vesicles [14]. Furthermore, has been described that MVEs formation, and consequently, exosome secretion can be related with breast cancer, phenomenon proposed as a cellular stress response [16].

Ceramides play critical roles in the alteration of membrane structures, for instance, these lipids are a factor that triggers the formation of channel-like structures in the outer mitochondrial membrane (OMM), modifying conditions such as permeability and ionic concentration; thus, these conditions could facilitate the flux of pro-apoptotic proteins such as cytochrome-C, Smac/Diablo, and Omi/HtrA2, molecules of apoptosis intrinsic pathway. Paradoxically, ceramides function in apoptosis development has allowed a more complex visualization of them, such as their role in cell differentiation and proliferation signaling pathways [17,18]. Ceramides have been described as regulatory lipids that modulate various sides of cell growth, survival, senescence, and apoptosis in cancer [19,20]. Wherein, a correlation between the levels of ceramides and the tumor stage has been demonstrated, ceramides metabolism has also been associated to chemotherapy resistance [19,20]. Then, ceramides play important roles in the regulation of cancer progression, and are linked to their function in meta-inflammation, a condition that associates overnutrition and obesity with a chronic low-grade inflammatory state [21,22], representing a key factor in the regulation of pathological processes. Therefore, in this work, we performed an analysis of the state of the art about the multifaceted role of ceramides in several pathological processes, with a focus on lipid metabolism and breast cancer.

## 2. Pathways of Ceramide Synthesis

Ceramide synthesis can be carried out by means of hydrolysis of sphingomyelin, de novo synthesis, and the salvage and recycling pathway; therefore, there is a continuous flux of these lipids in cells. For instance, de novo synthesis is activated by increased saturated fatty acid accumulation, wherein palmitoyl-CoA and serine are conjugated by SPT, producing the unstable molecule 3-ketosphinganine, which is rapidly converted to dihydro-sphingosine that undergoes N-acylations by the CerS, producing dihydroceramides. The function of CerS is considered a critical regulatory step, localized in ER and nuclear envelope. Later, the dihydroceramides are transformed by the dihydroceramide desaturase (DES 1 and 2) into ceramides. Subsequently, ceramides are delivered to the Golgi apparatus by vesicle transport, or through carrier proteins such as ceramide transfer protein (CERT) [23,24], which is the only described protein capable of transferring vesicle-independent ceramides among organelles [25].

CerS are composed of six variants whose function lies in the condensation of acyl-CoA of different lengths to its sphinganine. Differences among CerS variants are associated with transmembrane topology, specificity for long chain fatty acids, and tissue distribution [26], each CerS changes during development and is expressed according to the cell type [26]. CerS1 and CerS4 generate C18–C20 ceramides, CerS5 and CerS6 generate C14–C16 ceramides, CerS2 selectively generates C22–C24 ceramides [27,28], and CerS3 mediates the synthesis of very-long chain C28–C32 ceramides with

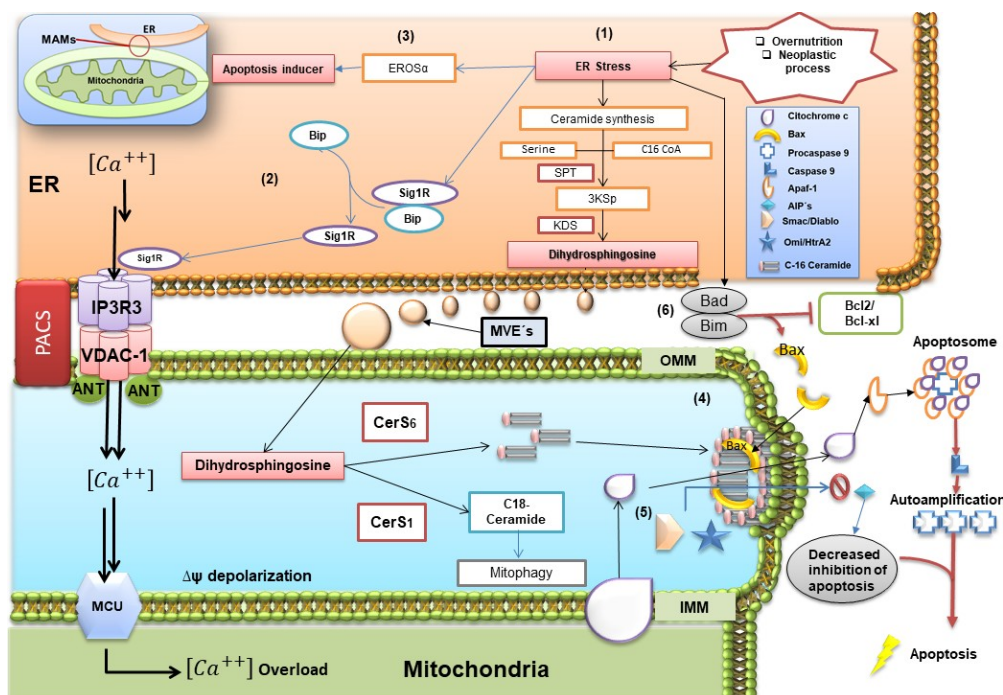
polyunsaturated fatty acids [29]. The activity of each CerS is determined by different post-translational modifications, as well as homo and heterodimerization.

Sphingomyelin is the main sphingolipid constituent of the plasmatic membrane, and ceramides generated by this pathway are produced by the hydrolysis of the phosphocholine head by the action of sphingomyelinase (SMase), which can be activated by extracellular signals such as oxidative stress, inflammation, and ionizing radiation [23]. Likewise, the salvage pathway can be activated by oxidative stress, this process begins in lysosomes or late endosomes wherein sphingomyelin and glycosphingolipids are hydrolyzed by the acid sphingomyelinase and  $\beta$ -glucosidase-1, respectively. Sphingolipids are released from these structures in the form of sphingosine and fatty acids, reaction catalyzed by acid ceramidase, this pathway could be regulated by PKC $\delta$  which activates sphingomyelinase. Furthermore, the recycling pathway involves deacylation of exogenous short chain ceramides by ceramidase to produce sphingosine, these pathways converge to obtain a product in common: ceramide produced by ceramide synthase [30]; likewise the recycling pathway has been involved in apoptosis [31]. Evenmore, gangliosides can function as precursors of ceramides, through the function of plasma membrane sialidase, to become sialosyl lactosyl ceramides [23].

Importantly, ceramide synthesis is activated by different cellular stimuli, including increased intracellular concentration of postprandial palmitate, hypoxia, intracellular stress, activation of the neutral sphingomyelinase [24,25], as well as inflammatory stimuli mediated by TLR-4 in response to TNF $\alpha$  and INF $\gamma$  signaling, inducing the expression of enzymes such as SPT [32]. Therefore, the activation of ceramide synthesis due to meta-inflammation as a result of overnutrition, could generate a deleterious circle by the activation of proinflammatory and pro-apoptotic signaling in metabolic tissues, modifying organelles structure, then the pathological state is amplified [33].

### 3. Ceramides, Association with Endoplasmic Reticulum and Mitochondria

Ceramide hydrophobicity represents an energetic barrier that prevents free movement among membrane structures; for instance, communication of ER and mitochondria requires physical contact of membrane proteins that facilitate the flow of molecules. Within structure of MAMs, enzymes involved in lipid biosynthetic pathways of ceramides and glycosphingolipids have been described, for instance, ceramide synthase, ceramide glucosyltransferase, glucosylceramide galactosyltransferase, and sialyltransferase [34]. Physiologically, there is a 5–20 % area of contact between ER and mitochondria, which suggests a considerable flow of molecules between these organelles [35,36] (Figure 2).



**Figure 2.** Overview of endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria interactions. ER stress phenomenon promotes the activation of the de novo ceramide pathway, producing an increase in the exportation of dihydrosphingosine and enzymes such as CerS1 and CerS6 through mitochondria-associated ER membranes (MAMs) or multivesicular endosomes (MEVs) to mitochondria (1), this originates the cleavage of Sig1R/Bip complex, Sig1R binds to IP3R3/VDCA-1 allowing the flow of  $Ca^{2+}$  through the ER to the inter-membranal space of the mitochondria by MCU (2), it can cross the inner mitochondrial membrane, producing a supersaturation in the mitochondrial matrix. This condition facilitates the activation of apoptosis by means of CHOP-dependent EROs $\alpha$  (3). In inter-membrane space, C16 ceramide leads to synthesis and assembly of pores that synergistically with Bax are translocated to OMM (4), this modifies the permeability of the membrane and allows the output of cytochrome C and proteins as SMAC/DIABLO and Omi/Htra (5). Later, cytochrome-C is associated with Apaf-1, promoting the change from procaspase-9 to caspase-9, leading to apoptosome formation. The complex Bad/Bim inhibits the antiapoptotic action of Bcl-2 and Bcl-xL, which in turn are associated with preventing the oligomerization of Bax with the pores, as well as inhibition of cytochrome C release (6). Image adapted from references: [4,14,18,37–39].

ER-mitochondria associations are not only restricted to synthesis and lipid flow: even more mitochondrial ATP transfer to the ER is critical for chaperone function in the activity of unfolded protein response (UPR). One of chaperones, BiP (Grp78), recruits the adaptor protein TRAF2 in cytoplasmic domains and activate ASK-1 and JNK kinase, which could target mitochondria through various signaling pathways such as phosphorylation of Bim, and Bad [40,41], proteins of the Bcl-2 family involved in cell progression pathways and apoptosis [42]. In an important way, by decreasing the fluidity of the mitochondrial membrane, ceramides attenuate the stability of MAMs, which are structures needed for tumor cells adaptation under conditions of metabolic stress [43] (Figure 2).

In this sense, phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (PACS-2) is implicated in ER-mitochondria tethering, which regulates MAMs formation [37]. The function of PACS-2 is dependent of Akt phosphorylation (Figure 2), which enables PACS-2 to be retained in MAMs [44]. Likewise, PACS-2 interacts with calnexin, a regulator of ER-mitochondria  $Ca^{2+}$  flux [45,46], and blocks BAP31 processing mediated by caspase 8 [37]. This interaction is the basis of PACS-2-mediated ER-mitochondria tethering, wherein BAP31 interacts with the mitochondrial Drp1 docking protein Fis1 [47]. However, this complex is associated with procaspase-8 under conditions of cell stress

where the mature form of caspase-8 triggers the formation of the BAP31 p20 fragment, an activator of mitochondrial fission [48]. Likewise, in cytoplasm, p53 can be located within the MAMs, wherein a fraction of p53 could stimulate the activity of the Sarco/ER  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase pump, regulating  $\text{Ca}^{2+}$  levels in ER. In fact, under pro-apoptotic conditions, its downward activity causes an overload of  $\text{Ca}^{2+}$  inside the mitochondria, which is a factor of formation of mitochondrial permeability transition pores [4].

Intracellular increase of ceramides modifies several signaling pathways that maintain cell homeostasis [49]. For instance, longer acyl chain ceramides decrease membrane fluidity of mitochondria [50]. Specifically, the presence of two species of ceramides *N*-acetyl-D-erythro-sphingosine C2 and *N*-palmitoyl-D-erythrosphingosine C16, has been associated together with other proteins to formation of channel-like structures, then increasing permeability of OMM. These structures could facilitate the movement of proteins from the inter-membrane space to the cytoplasm, such as the inducing factor of apoptosis, cytochrome C, procaspases, and several heat shock proteins [51,52]. Nevertheless, this proposal has been questioned; moreover, Lee et al. (2011) [53] propose that ceramides facilitate the effect of Bax, a pro-apoptotic protein, which directly could trigger the pore formation on OMM [53].

Experimentation on mitochondria of hepatocytes deleted of Bax showed increasing levels of cytochrome C releasing under Bax treatment than stimulation with C16 ceramide alone, even at high doses. In addition, minimal doses of C16 ceramide and recombinant Bax, potentiated the release of cytochrome C. Therefore, C16 ceramide is not considered a direct inducer of increased permeabilization of OMM, while it improves the insertion of Bax on OMM [53]. Although the release of these proteins promotes the activation of several caspases and DNases, other mitochondrial effects appear, such as the increase in ROS, alterations in calcium homeostasis of MAMs, modifications of several components of the ECT, as well as reduction in ATP concentration with the consequent collapse of inner mitochondrial membrane (IMM) potential.

While ceramides are lipids capable of inducing the destabilization of OMM, leading to increased membrane sorting and inducing gel/fluid phase separation possibly to form channels, the characterization of these channel-structures shows that only proteins could have the stability to form these structures. Considering that pore formation, as the main mechanism of mitochondrial permeabilization, has been questioned due to a thermodynamic barrier. Even more, the concept of an increased permeability induced by a surface mismatch between the two mitochondrial monolayers has been proposed [54]. Notwithstanding, *in vitro* studies with liposomes treated with C16 ceramides and supported by electron microscopy and molecular dynamic simulations, have suggested the pore structure formation [55]. In this proposal, ceramide molecules are organized in columns arranged in anti-parallel way originating a cylindrical shape spanning the hydrophobic interior of the OMM [52,56,57]. These phenomena could be dependent on the long chain and the degree of unsaturation of acyl chain of ceramides [4,38]. Nowadays, the debate on the proposal that explains this process in function of thermodynamic feature, still remains.

Likewise, in mitophagy, a physiological process in which cells eliminate dysfunctional mitochondria, ceramides have been described that induce mitophagy, targeting mitochondria that contains LC3B-II autophagolysosomes [58]. Specifically, C18 ceramides have emerged as tumor suppressors. CERS1 expression generating C18 ceramides mediates the localization of ceramide on the OMM, leading to mitophagy. Target mitochondria through LC3—an important component in the formation of autophagosome which is conjugated with phosphatidyl-ethanolamine through the C-terminal domain forming LC3B-II [58,59]—binds ceramides on the mitochondrial membrane upon DNM1L/DRP1, leading to inhibition of mitochondrial function and oxygen consumption [58]. In this sense, the interaction LC3B-II-ceramide involves the central hydrophobic domain of the protein [60].

#### 4. Role of MAMs in Neoplastic Pathology

The role of MAMs has been considered a fundamental feature of the anti-apoptotic effect in neoplastic cells, mainly due to the control of  $\text{Ca}^{2+}$  flux, and the handling of ROS balance, generated

by uncontrolled growth and/or antineoplastic therapy [43]. Moreover, the localization of oncogenic and/or tumor suppressor proteins in these special areas of contact ER/mitochondria, participating in the physiological signaling pathways, have direct implications in the development of neoplastic pathology [43]. Currently, several mechanisms have been associated with the function of MAMs in several types of cancer, such as breast, lung, prostate, hematopoietic, and/or lymphoid neoplasias. For instance, the sigma 1 receptor (S1R) in normal tissue is associated with chaperone protein BiP/GRP78 within the area of MAMs [41]; in contrast under conditions of stress it is uncoupled from the BiP, to bind IP3R3, liberating  $\text{Ca}^{2+}$  from the ER to the MAMs. On the other hand, S1R is translocated under chronic stress towards the periphery of ER, and thereby attenuates the cell death signal that would generate  $\text{Ca}^{2+}$  overload in mitochondria and then, ER  $\text{Ca}^{2+}$  depletion during chronic conditions [61].

MAMs perform microzones of anchoring enzymes that maintain oxidative homeostasis, such as endoplasmic reticulum oxidoreductase-1 alpha (ERO-1 $\alpha$ ), with which overexpression in tumor tissue is associated with poor prognosis [62]. In addition, a strong correlation among the levels of ERO-1 $\alpha$  and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) is proposed, allowing the escape of the immunological attack, and confining an immunosuppressive phenotype [63]. However, ERO-1 $\alpha$  also participates in cell death mediated by activation of compound 1 activator of procaspase (PAC-1), inducing apoptosis in several tumors [39]. In this sense, ERO-1 $\alpha$  shows a dual role in neoplastic pathology, previously mentioned in the implication of oxidative balance and the presentation of immuno-tolerance with anti-apoptotic characteristics, in contrast to cell death via activation of PAC-1 pro-apoptotic feature [39]. In addition, within the structure of MAMs, the PERK arm of UPR is localized [64], its deficiency showed an association with tumors of low proliferation, because PERK triggers mechanisms that maintain redox balance [65].

In colon and breast cancer, ATAD3 has been described as functioning in conjunction with GRP78 within the MAMs, to keep the stability of WASF3, one function of which is the activation of actin polymerization, participating in the metastatic phenomenon, and leading to a bad prognosis [66]. Interestingly, ATAD3 has been pinpointed in the vicinity of the lipid transfer zone between ER and mitochondria [67], the aforementioned is important for maintain the integrity of the lipid bilayer of the mitochondria [68,69]. In lung cancer, the expression of variants of the Bcl-2 family has been described, for instance the presence of Bcl-2 [70,71] and Bcl-XL [72] is associated with an anti-apoptotic phenotype in non-small cell lung carcinoma. On the other hand, myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), another member of the Bcl-2 family within MAMs, activates the voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC-1), increasing the flux of  $\text{Ca}^{2+}$ , then cell migration [73].

In addition, hexokinase-2 (H2K) is over-expressed in cancer cells, wherein glycolysis has been described to show an important role in the initiation and neoplastic development in models of mice with K-Ras driven lung cancer and Her2/Neu-driven breast cancer [74]. However, the phosphorylation of H2K dependent of Akt causes the translocation of H2K to the MAMs, wherein maintains interaction with VDAC-1, in this manner H2K takes advantage of the emerging ATP of the channel formed by VDAC-1, catalyzing the first reaction of glycolysis, in this way contributes to the Warburg effect [75], a metabolic adaptation to hypoxic microenvironment due to lack of blood supply, and fundamental in the survival neoplastic during early stages.

In this sense, lactate produced by anaerobic glycolysis in Warburg effect generates an acid microenvironment that activates the VEGF signaling pathway, a proper condition to tumor growing [76]. This hypoxic condition leads to activation of HIF $\alpha$ , which, in collaboration with c-Myc activate pyruvate dehydrogenase kinase 1 [77], reduces mitochondrial oxygen consumption and promotes anaerobic glycolysis, then lactate synthesis [78]. Recently, MAMs have been proposed as regulators of cancer cells metabolism due to their function in  $\text{Ca}^{2+}$  exchange between ER and mitochondria, which is needed for oxidative phosphorylation [79]. Therefore, alteration of MAMs could lead to modifications of  $\text{Ca}^{2+}$  exchange and ATP production [80]. Moreover, some proteins within the MAMs have been proposed as potential regulators of tumor cell metabolism, for instance, TMX1 is

related with glycolysis and oxidative phosphorylation balance [80], mitofusin-2 as an important regulator on MAMs contact has been associated to pro-apoptotic and anti-proliferative signaling [81], and PACS-2 proposed as a tumor suppressor [82].

While MAMs connect membrane surfaces between mitochondria-ER, these associations harbor multiple enzymes and proteins, which allow cell homeostasis preservation and, thus, survival in neoplastic pathology [43]. MAMs represent a focus of therapeutic target for antineoplastic therapy, due to its associations with responses to oxidative stress and harmful microenvironments, favoring resistance to pro-apoptotic stimuli in cancer cells [83]. Indeed, the use of ceramides as coadjuvant therapy with different antineoplastics, is a novel treatment option due to its multifactorial participation in the structure and function of MAMs [84]. In line with this notion, ceramides are bioactive lipids that modulate processes such as proliferation and cell cycle, key events in the development of cancer [19,20]. Various reports have shown that cancer cells strictly modulate ceramide metabolism [19,20,85]. For instance, sphingolipid metabolism has been reported to regulate cancer development, progression, metastasis and resistance to therapy, some mechanisms have been described to explain how ceramides could regulate these processes specifically in breast cancer [19,20].

## 5. Ceramides and Breast Cancer

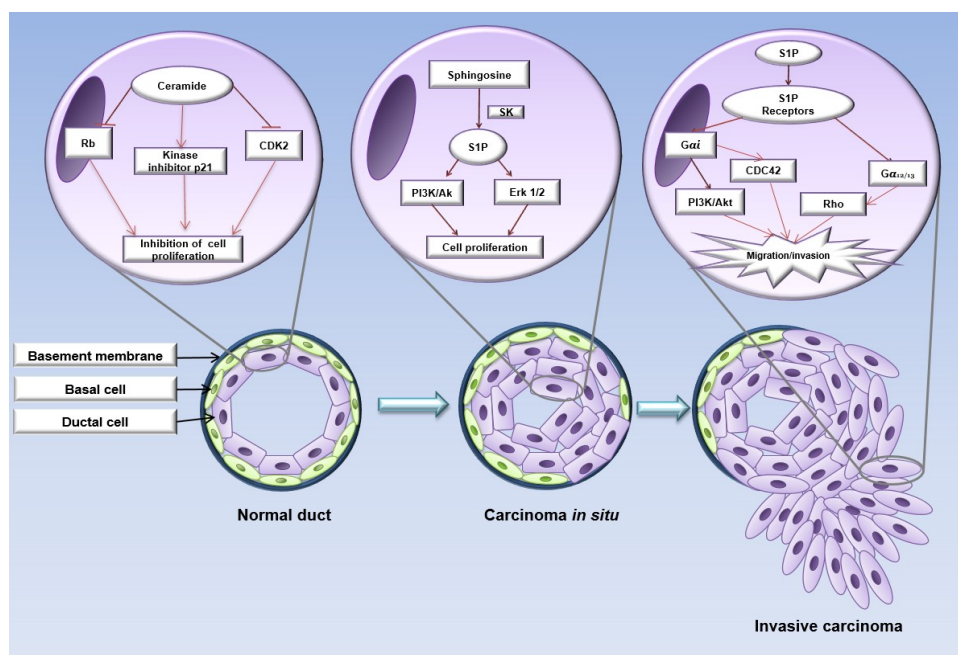
Ceramide-1-phosphate and glucosylceramides regulate proliferative processes, while dihydro-sphingosine, ceramides, and sphingosine promote apoptosis [19]. While, the effects of ceramides in various cell types are pleiotropic, functioning as inhibitors of cell proliferation, ceramide levels are down-regulated in most types of cancer via decreasing levels or activities of enzymes involved in ceramide synthesis, and/or increasing the activity of enzymes associated with degradation. For instance, in breast cancer cell lines, ceramides promote cell cycle arrest by mechanisms such as the induction of the dephosphorylation of the Rb retinoblastoma protein, the activation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, and the inhibition of the cyclin-dependent kinase CDK2 [86,87], additionally to promotion of pore formation mechanisms in OMM [88]. Indeed, taking into account the inducer effect of apoptosis in breast cancer, ceramides are considered a tumor suppressor lipid [86,89,90].

In this sense, acid ceramidase is an enzyme that deacylates ceramides in the ceramide metabolic pathway to sphingosine, which is further phosphorylated by sphingosine kinase (SphK) to generate sphingosine-1-phosphate (S1P). Interestingly, ceramides have been shown to induce apoptosis, whereas S1P could regulate cell survival, proliferation, and angiogenesis in cancer cells [19,91]. S1P is described to exert multiple responses, such as proliferation, survival, and cytoskeletal rearrangement, via its G protein-coupled receptor (GPCR) in several cell types, promoting the activation of Rho and CDC42 GTPases, and MAPK, PI3K/Akt pathways. S1P is synthesized from sphingosine by SphK; two isoforms of mammalian SphK (SphK1 and SphK2) have been characterized. Likewise, the S1P has been shown to accumulate in the tumor microenvironment [19,92] (Figure 3).

Therefore, the role of sphingolipids in the development of breast cancer has been controversial, however cancer cells that maintain an active proliferation specifically present low levels of ceramides, by up-regulating enzymes that metabolize these lipids, resulting in conditions of resistance to apoptosis [85,93]. Previous studies described different expression profiles of the sphingolipids enzymes in cancerous tissue relative to normal tissue. Schiffmann et al. showed that endogenous ceramide level was significantly elevated in malignant breast tissue, indicating that elevation of sphingolipid levels correlates with disease status [94]. Particularly, the mammary tumor tissue showed high levels of C16:0-Cer, C24:1-Cer and C24:0-Cer in comparison with non-tumoral tissue, and this increase was associated with higher expression of ceramide synthases CerS2, CerS4 and CerS6. Interestingly, levels of C18:0-Cer and C20:0-Cer were associated with positive tumors for the estrogen receptor, while high levels of C16:0-Cer were linked with metastasis to lymph nodes [94,95].

On the other hand, increasing ceramide levels using ceramide analogs effectively induce apoptosis of breast cancer cells. The stimulation of breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231 with the

analog of ceramide (2*S*,3*R*)-(4*E*,6*E*)-2-octanoylamido-octadecadiene-1,3-diol promotes apoptosis by translocation of phosphatidylserine to the outer monolayer of the cell membrane and deregulation of mitochondrial membrane potential and released of cytochrome C [96,97]. Therefore, ceramides have been proposed as a therapeutic target for specific types of cancer by synergism with several drugs, as potent tumor suppressors, and acting as second messengers in signal transduction and regulation of proliferation, differentiation, senescence, and apoptosis [85,93]. Chemotherapeutic drugs can induce the endogenous accumulation of ceramides, promoting cancer cells apoptosis, evidence suggests that modulation in the lipid metabolism may be effective to improve tumor cells susceptibility to antineoplastic drugs. Indeed, several chemotherapeutic agents increase the synthesis of ceramide through the activation of SMases or de novo pathway, such as gemcitabine, camptothecin, etoposide, cisplatin, fludarabine, and daunorubicin [98,99]. Furthermore, anti-tumoral treatment modulates the expression of the receptors for S1P. In MCF7 breast cancer cells, tamoxifen and medroxyprogesterone treatment induces an increase of S1P2 expression, while this same treatment induces a down-regulation of S1P3 [100]. However, the biological mechanism that causes this phenomenon has not been described. For instance, treatment of P388 and U937 leukemia cells with daunorubicin promotes apoptosis by increasing ceramide levels by de novo pathway [101]. Subsequently, in the next chapters we are going to analyze the critical steps in cancer progression and the role of ceramide metabolism.



**Figure 3.** Schematic view of sphingolipid role in breast cancer progression. Structurally, the mammary ducts are composed of basal membrane, a layer of myoepithelial cells and another of luminal ductal cells. In the normal mammary epithelium, ceramides negatively regulate the Rb and CDK2 proteins, inhibiting cell proliferation. In carcinoma in situ, luminal tumor cells present an abnormal metabolism of ceramides, where sphingosine-1-phosphate (S1P) through S1PR promotes activation of the PI3K/Akt and MAPK pathways, inducing cell proliferation. The loss and/or degradation of the basement membrane allow the tumoral cells to migrate and invade the surrounding tissue. In this stage, S1PR promotes GTPases activation such as Rho and CDC42, inducing tumor invasion and consequently, metastasis. Image adapted from references: [12,19,92,102].

## 6. Involvement of Ceramides and Sphingolipids in the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)

EMT is an important process involved in embryonic development, wound healing, fibrosis, and breast cancer metastasis [103,104]. The EMT process implies that epithelial cells progressively

acquire a mesenchymal phenotype. It is characterized by a decrease in E-cadherin and cytokeratin (CK) 8/18 levels, loss of apical-basal polarity, junctions dissociation, cytoskeleton reorganization, an increase in N-cadherin and vimentin levels [103], as well as matrix degradation and an enhanced ability for cell migration and invasion. Cells that have undergone all these modifications have transitioned from an epithelial to a mesenchymal phenotype [103,104].

For instance, in mouse mammary epithelial cells under the EMT process, a modulation in the metabolism of gangliosphingolipids has been determined. Galp $\beta$ 1-3GalpNAc $\beta$ 1-4Galp $\beta$ 1-4Glc $\beta$  (Gg4) is involved in the regulation of EMT, since the concentration of this lipid is reduced in transdifferentiate cells into mesenchymal cells. In addition, Gg4 forms complexes with proteins such as E-cadherin and  $\beta$ -catenin, preventing its degradation and favoring the epithelial phenotype [99]. Additionally, the differential expression of enzymes related to the ganglioside metabolism observed in EMT is associated with the regulation of transcription factors such as Snail1, ZEB1, and Twist, key EMT-inducing proteins [105].

Likewise, mammary epithelial cells under EMT showed a decrease in the levels of Ceramide C16:0, as well as CerS6. Mammary epithelial cells treated with TGF- $\beta$  have decreased levels of CerS6, a phenomenon observed in patients with triple negative breast cancer (TNBC) mesenchymal cells [106]. The decrease of C16:0 ceramide levels in patients with TNBC are associated with migratory and invasive capacity of tumor cells. In addition, the down-regulation of CerS6 in tumors is associated with mesenchymal phenotype, as well as aggressive malignancies and poor prognosis [106].

As previously described, S1P is a bioactive lipid that regulates several responses including inflammation, survival, and cell migration [102]. Forming complex with their respective receptors (GPCRs), S1P promotes the activation of non-receptor kinases such as FAK, Src, as well as GTPase Rac, regulatory proteins of cell migration and invasion [102]. In human mammary non-tumorigenic epithelial cells MCF10A, a cellular model for the study of EMT, treatment with S1P induces the activation of the S1P3 receptor, promoting the activation of Erk  $\frac{1}{2}$ , Rac, Akt, and PI3K, and an increase in the expression and secretion of MMP-9. Moreover, S1P induces an increase in migratory and invasive capacity of mammary epithelial cells, promoting an EMT-like process in MCF10A cells [102] (Figure 4).

Recently, a study performed in human breast cancer patients showed that ceramide levels are elevated in breast tumor tissue compared to adjacent tissue and/or non-tumor tissue [90]. In addition, the enzymes involved in the de novo pathway, in the salvage and the sphingomyelin pathways are overexpressed in cancerous tissues, accompanied by an increase in the levels of multiple ceramides (C14: 0, C16: 0, C18: 1, C18: 0, C20: 0, C22: 0, C24: 1, C24: 0, C26: 1 and C26: 0), increase in the levels of monohexacylceramide species (C14: 0, C16: 0, C18: 1, C18: 0, C20: 0, C22: 0, C24: 1, C24: 0, C26: 1 and C26: 0), and an increase in sphingomyelin levels (C14: 0, C16: 0, C18: 1, C18: 0, C20: 0, C22: 0, C24: 1, C24: 0, C26: 1 and C26: 0), as previously mentioned these are related with an aggressive phenotype [90].

Interestingly, the metabolism of ceramides is associated with invasiveness and metastasis. For example, key regulatory enzymes in the ceramides and sphingolipid metabolism such as glucosylceramide synthase [26,107], acid ceramidase [108,109], and ceramide kinase [110,111] are overexpressed in mammary tumor tissue and/or breast cancer cell lines, suggesting a strong association between ceramides and their intermediates on tumor progression. Therefore, this broadens the understanding of the role of this class of lipids.

## 7. Ceramides and Sphingolipids and Their Implication in Breast Cancer Metastasis

In mammary tumor progression, the development of new blood vessels, denominated tumor angiogenesis, is a critical process. In this sense, S1P and S1P receptors have been described as key regulators of this process [112]. It has been shown that S1P induces an increase in intracellular calcium concentrations and migration of HUVECs cells through the activation of the S1P receptor [113]. Additionally, S1P promotes an increase in the proliferation and chemotaxis of HUVEC cells accompanied with enhanced in vitro angiogenesis [113,114]. This data confirms the involvement

of molecules such as S1P and its receptors as modulators of angiogenesis and reflects its importance in tumor vascularization.

Considering the importance of ceramides in the regulation of multiple tumor processes, recently the ceramide nanoliposomes effect on mammary tumor cells cultures has been described. In MDA-MB-231 cells, the treatment of C6 ceramides encapsulated in liposomes (ceramide nanoliposomes) was able to significantly increase apoptosis under non-adherent conditions (anoikis), accompanied by an increase in caspase 3/7 activity [115]. In addition, the ceramide nanoliposomes promoted a decrease in cell migration, associated with a diminution in the secretion of IL-6 and IL-8 in MDA-MB-231 cells [115].

Therefore, the interrelation between growth factors and the metabolism of sphingolipids in breast cancer cells has been demonstrated. For example, it has been shown that the treatment of MCF7 mammary tumor cells with epidermal growth factor (EGF) promotes an increase in the expression of sphingosine kinase 1, an enzyme required for cell proliferation and migration [116,117]. Interestingly, in the same cell line, the oestrogen-induced transactivation of EGFR depends on the sphingosine kinase pathway and S1P, a process accompanied by the activation of Src and matrix secretion of metalloproteinases, proteins highly involved in the regulation of migration, invasion, and tumor metastasis [117].

Finally, it is important to highlight the differences between events regulated by ceramides, sphingolipid-metabolites, and S1P. For instance, the presence of high levels of ceramides and their producing enzymes (CerS2) leads to a decrease in the secretion and activity of metalloproteinases, resulting in poorly invasive phenotypes of breast cancer cell lines [118]. In the other hand, the role of S1P as a modulator of cell invasion and metastasis has been demonstrated. In human glioblastoma cells, S1P induces an increase in the secretion and activity of metalloproteinases, leading to the degradation of extracellular matrix, invasion of local tissue and finally, metastasis [119]. Additionally, S1P receptors play an important role in breast tumor development. It has been determined that sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P<sub>1</sub>) is over-expressed in multiple breast cancer cell lines, positively regulating processes such as tumor migration and invasion. In line with this notion, the down-regulation of S1P<sub>1</sub> inhibits cell proliferation, colony formation, migration and invasion [120].

Studies show that sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1P<sub>3</sub>) is over-expressed in invasive breast cancer cell lines, resulting in an increase in the expression of COX-2 and in microsomal prostaglandin (PG) E2 synthase, accompanied by a high synthesis of PGE2 and favoring tumor metastasis [121]. S1P<sub>3</sub> has been involved as a regulator of blood-brain barrier permeability. In the breast cancer brain metastasis, the surrounding astrocytes express high levels of S1P<sub>3</sub>, which regulates and promotes the secretion of CCL2 and IL-6, leading to the relaxation of endothelial cell adhesion and increases the permeability of the blood-brain barrier [122].

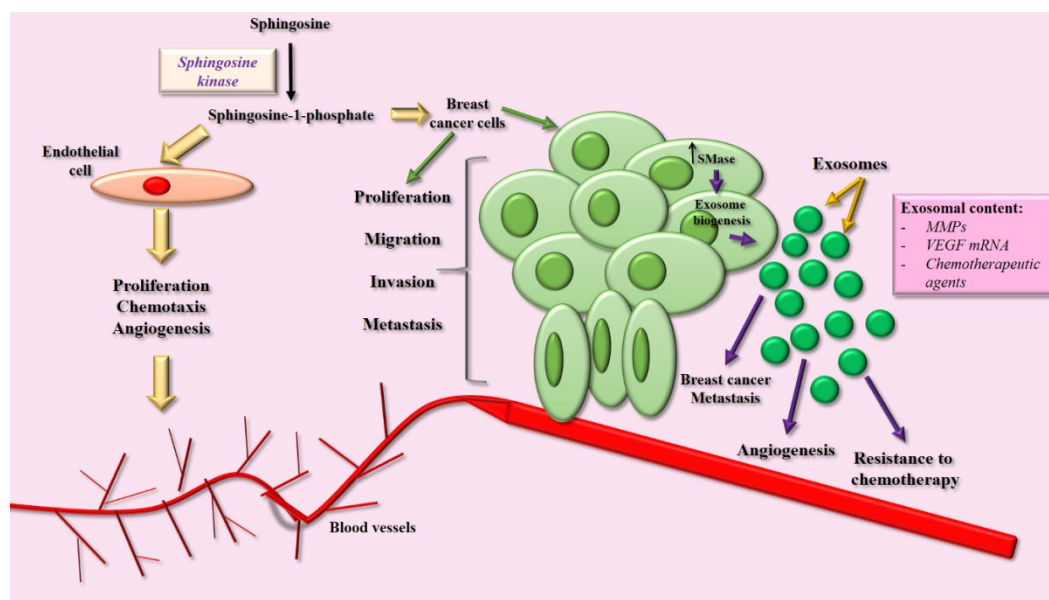
This data strongly suggests that the subtle balance between the metabolites and enzymes producing ceramides/sphingolipids in tumor cells leads to the modulation of mammary tumor progression, highlighting the role of these molecules and their receptors as potential targets for breast cancer intervention, specifically associated to metastasis.

## 8. Exosome-Ceramides and the Role in Tissue Communication

Extracellular vesicles are spherical structures surrounded by a bilayer lipid membrane that are found in several body fluids and are secreted by a wide variety of cell types, including tumor cells [123]. According to the International Society for extracellular vesicles, these structures are classified depending on their size and biogenesis in apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes [124,125]. Particularly, the exosomes are originated from MVEs, presented average size of 30–100 nm. In different types of cancer, altered levels of exosome release are observed, and their number, composition, and cellular origin depend on the state of the disease [124]. Moreover, it has been shown that exosomes regulate processes of tumor progression, such as proliferation, migration, invasion, metastasis, immunosurveillance, and evasion [126], as well as resistance to chemotherapy, denoting them as

an important feature in the study of breast cancer progression [123]. Once secreted, exosomes mediate intercellular communication in autocrine, paracrine, and endocrine pathways. The exosomes modulate the functions of target cells by interacting with surface proteins of vesicles with membrane receptors and being endocytosed by the target cell. In this way, the target cells uptake the set of charged molecules present in the exosomes, resulting in modulation of the cellular responses [123,124]. For instance, exosomes secreted by glioma cells transport and transfer EGFRvIII, a constitutively active oncogenic form of EGFR, then acceptor tumor cells show an increase in cell proliferation and survival [127]. Several studies have shown that cancer cells resistant to doxorubicin and cisplatin release high amounts of these molecules through exosomes, therefore their release contributes to tumor cell survival [128,129]. Moreover, cancer cell-derived exosomes contain MMP-2 and MMP-9, enzymes that degrade components of the extracellular matrix, facilitating the invasion of tumor cells into the surrounding tissue (Figure 4) [130]. Furthermore a recent study shows that tumor-secreted exosomes could facilitate metastasis even for tumour cells that lack the capacity to metastasize and this could be regulated by their pattern of integrins expression [131].

Exosome-composition depends on the cells from which they originate, including proteins, nucleic acids (RNA, DNA), and lipids [123,132]. Interestingly, sphingolipids have been associated with the biogenesis and secretion of exosomes. Accumulation of sphingolipids and the high activity of sphingomyelin phosphodiesterase (SMase) generates an increase in levels of free ceramides, associated with the formation of exosomes [124,125,133]. Compared to their parental cells, exosomes secreted by various cell types are enriched with various bioactive lipids such as eicosanoids, fatty acids, ceramides, and sphingomyelin [134,135], therefore, these molecules can be transferred to the acceptor cells. For instance, it has been determined that sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1P<sub>2</sub>) is secreted and transported in exosomes derived from MDA-MB-231 breast cancer cells. Indeed, the exosomes that transport S1P<sub>2</sub> are taken-up by cancer-associated fibroblasts (CAFs), resulting in an increase in CAFs proliferation dependent on ERK  $\frac{1}{2}$  signaling [136].



**Figure 4.** Ceramides and sphingolipids in breast cancer progression. S1P is a critical molecule involved in the modulation of angiogenesis. In endothelial cells, it has been demonstrated that S1P promotes proliferation, migration, and chemotaxis, resulting in the generation of intra-tumoral blood vessels that facilitate the process of metastasis. Moreover, S1P induces migration and invasion of breast cancer cells, promoting the process of tumor intravasation. Finally, in tumor cells, the SMase enzyme shows high activity, promoting the biogenesis and secretion of exosomes, extracellular vesicles that modulate angiogenesis, metastasis, and resistance to chemotherapy. Image adapted from references: [14,120,132,136].

In addition, S1P is associated with several cellular processes such as angiogenesis, cell growth, motility, and in an important manner can be contained and transported by lipoproteins, the high density lipoproteins (HDL) being the main carrier. Approximately 60% of circulating S1P is associated to HDL, likewise HDL can carry on other sphingolipids such as sphingomyelins and ceramides (C:24) [137–139]. HDL is known for its anti-atherogenic function due to its composition of apolipoproteins, among which ApoM is found, whose function is to bind to S1P [140]; both ApoM and S1P are synthesized and secreted by the liver [141]. Although S1P has been considered as a cardioprotective molecule, S1P is described as a possible mediator of HDL-dependent angiogenesis, due to its interaction with receptor S1P<sub>3</sub>, whose activation promotes the expression of VEGFR2 [142]. Therefore, S1P is a moonlighting molecule, although it has a cardioprotective role through angiogenesis activation, this same effect can be detrimental favoring tumor proliferation. In this sense, S1P<sub>3</sub> has been found up-regulated in breast cancer cells, a condition associated to increased migration and invasion of metastatic cells induced by an inflammatory environment in a COX-2-PGE<sub>2</sub>-dependent pathway [121].

On the other hand, S1P is capable of activating the matriptase, a serine protease with an important role in tissue remodeling [143], whose overexpression found in breast cancer tissue is associated with a poor prognosis [144] through activation of PAR-2-NF- $\kappa$ B and PI3K-Akt-mTOR, pro-inflammatory and pro-oncogenic signaling, respectively [145]. Likewise, matriptase has been implicated in invasiveness and metastasis in prostate cancer [146,147]. Recently, M69 antibody has been employed in TNBC cells with overexpressed matriptase [148] indicating that this S1P-activated enzyme has an important role on breast cancer therapy.

## 9. Role of Ceramides in Chemoresistance

Ceramides have been proposed as key regulatory molecules in breast cancer chemoresistance, being even considered as sensitizers to chemotherapy. The poor response in chemotherapy is a phenomenon commonly observed in breast cancer, however, is exacerbated in TNBC cells, a breast cancer subtype with a poor prognosis [149,150]. Several cell pathways have been proposed as triggers of neoplastic processes in TNBC, such as CD73, CD133, IMP3, ABCG2, HSF1 and PI3K/AKT/mTOR [150–155]. In breast cancer patients studied by Che J., et al., it has been found that after exposition to doxorubicin, cyclophosphamide, fluorouracil or its combination, ceramides levels decreased, indicating that its down-regulation is a common intrinsic response against breast cancer chemotherapy [20]. This subside response of ceramides concentration was determined in mammary tumor tissue, while in untreated women the levels remain unchanged [5]. Specific enzymes of ceramide metabolism have been characterized, UDP-glucose ceramide glucosyltransferase (UGCG) levels were higher after exposition to chemotherapeutic agents as doxorubicin, which lead to decreased ceramide levels [148]. Thus, specific inhibition of UGCG led to higher ceramide levels and this enhanced the sensitivity to doxorubicin and cyclophosphamide in MDA-MB-231 cells [20]. Zhang X. et al., reported that doxorubicin treatment induced the expression of UGCG in MCF-7 cells, an estrogen receptor (ER $\alpha$ ) positive model, while this phenomenon is absent in MDA-MB-231 (ER $\alpha$  negative), suggesting an association between the ER $\alpha$  and the UGCG [156].

Moreover, UGCG is involved in multidrug resistance processes, especially in breast and colon cancer [157,158]. For instance, in one study the effects of UGCG on multidrug resistance protein 1 (MDR1) levels was characterized, which concluded that UGCG, specifically Gb3 and Gb4 up-regulates expression of MDR1 through  $\beta$ -catenin signaling, granting doxorubicin and paclitaxel resistance to murine breast cancer cells [159]. In addition, hyper-methylation of CpG islands in 5' regions of UGCG promoter leads to its inhibition and subsequently to a major sensitivity to chemotherapy in breast cancer cells. In this investigation, authors demonstrated that methylation of UGCG promoter is performed by DNA methyltransferases (DNMTs). The UGCG promoter can be demethylated after the effect of DNMTs inhibitor 5-Aza-dc (Azacitidine), which has been used for therapy at hematological neoplastic processes, indicating the direct relationship between UGCG methylation and cell chemo-sensitivity [160].

Tamoxifen treatments have been reported to increase levels of C16, dHC16, C18, C20, dHC20, dHC22 ceramides in 4T1, MCF-7 and MDA-MB-231 cells, processes accompanied to JNK phosphorylation, caspase-3 and PARP cleavage, both conditions known as markers for cell death, suggesting that tamoxifen also induces cell death in a ceramide-dependent manner [161]. Moreover, tamoxifen shows an antagonist effect over P-gp, a protein with a flippase activity which transports glucosylceramides into Golgi lumen, and this inhibition results in a decreased ceramide glycosylation that leads to increased ceramide levels. Likewise, inhibition of the activity of acid ceramidase by tamoxifen has been reported. Therefore, tamoxifen effects on activation of cell death markers, diminution of ceramide glycosylation, and acid ceramidase inhibition explain its role at enhancing sensitivity to chemotherapy in breast cancer cells [162]. In addition, RIP2, an important mediator of innate immunity, has been recently studied as a modulator of breast cancer survival by Jafaar R., et al., whose results indicate that this kinase confers resistance to ceramide-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells treated with paclitaxel [163]. Thus, RIP2 inhibition can be proposed as a novel target to improve ceramide-induced apoptosis and then, a better antineoplastic drugs response.

## 10. Final Considerations

Ceramides are a species of sphingolipids whose functions have become relevant due to their various intracellular and signaling functions, some of them involved in pathological processes. Sphingolipid metabolism presents moonlighting effects on neoplastic processes due to its multiple metabolites, for instance ceramides being the proapoptotic intermediates, glucosylceramides the inducers of chemoresistance, and S1P the mitogenic sphingolipid [162]. Thus, it is critical to deepen the knowledge about why the increase in ceramides during initial stages of oncogenic processes favors the survival of the tumoral cells, but later becomes cytotoxic, opposed to the early phases. Evidence suggests that ceramide metabolism is associated with the efficacy of breast cancer therapeutics, several reports have evaluated the possibility to use ceramides as a vehicle in cancer treatments. Therefore, a better understanding of the mechanisms by which sphingolipids regulate cancer cell signaling and metabolism will improve the development of therapeutics.

The aim of this work was to describe an integral relationship between ceramide metabolism and breast cancer development and progression, highlighting its importance in the modulation of key processes such as apoptosis, proliferation, EMT, migration, invasion, and metastasis, resulting in a highly comprehensive and novel work that contributes to the better understanding of tumor ceramides metabolism. Therefore, this work represents a new approach to mechanisms that trigger cancer development and the role of ceramides.

Ceramides function on cell apoptosis has been demonstrated, then these lipids are closely related to mitochondrial structure alterations, facilitating the flow of pro-apoptotic proteins from the intermembrane space into the cytoplasm; also, they exert intracellular effects on insulin signaling induced by meta-inflammation. Therefore, ceramides can be visualized as a hub in the cellular metabolism by functioning as molecules with dual roles, as under stress conditions, which lead to inflammation, they regulate several functions such as apoptosis, and even subtle phenomena in the regulation of cellular cancer signaling mechanisms. The specific conditions in which these lipids will become pathological molecules is a subject pending elucidation.

**Author Contributions:** Conceived the idea: V.G.-G. and O.G.-H. Wrote the manuscript: V.G.-G., I.M.-N., J.F.D.-V., O.G.-H., G.H.-U. and A.A.P.-A. Figures preparation: I.M.-N., J.F.D.-V., O.G.-H., G.H.-U. and A.A.P.-A. Critically reviewed manuscript and figures: V.G.-G., J.F.D.-V. and O.G.-H. All authors approved the final manuscript.

**Funding:** This study was supported by Coordinación de Posgrado e Investigación-UABC grant 106/2/N/57/1 (1983), Convocatoria Especial para PTC 2015/2016 UABC grant 1984, PRODEP UABC-PTC-487, and XVI Convocatoria de Apoyo a la Movilidad Académica 2018-ID1286.

**Acknowledgments:** The authors recognize the helpful contribution of Gisel Ivonne Aceves-Franco, who critically reviewed and edited the manuscript, and José Antonio Uribe Vizcarra for contribution in the design of graphical abstract.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

ER	Endoplasmic reticulum
FFA	Free fatty Acids
SFA	Saturated Fatty Acids
ECT	Electron transport chain
ROS	Reactive oxygen specie
DAGs	Diacylglycerols
INSR	Insulin receptor
SPT	Serin-palmitoyl acyltransferase
CerS	Ceramide synthase
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
MVEs	Multivesicular endosome
ESCRT-I	Endosomal sorting complex required for transport
OMM	Outer mitochondrial membrane
DES	Dihydroceramide desaturase
CERT	Ceramide transfer protein
SMase	Sphingomyelinase
UPR	Unfolded protein response
PACS-2	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2
IMM	Inner mitochondrial membrane
ERO-1 $\alpha$	Endoplasmic reticulum oxidoreductase-1 alpha
PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
PAC-1	Compound 1 activator of procaspase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1 Mcl-1
VDAC-1	Voltage-dependent anion-selective channel 1
H2K	Hexokinase-2
GPCR	G Protein-coupled receptor
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SphK	Sphingosine kinase
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
CK	Cytokeratin
Gg4	Galp $\beta$ 1-3GalpNAc $\beta$ 1-4Galp $\beta$ 1-4Glc p $\beta$
TNBC	Triple negative breast cancer
EGF	Epidermal growth factor
Er $\alpha$	Estrogen receptor
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
5-Aza-dc	Azacitidine
MAMs	Mitochondria-associated ER membranes
MDR1	Multidrug resistance protein 1
DNMTs	DNA methyltransferases

## References

1. Acosta-Montano, P.; Garcia-Gonzalez, V. Effects of dietary fatty acids in pancreatic beta cell metabolism, implications in homeostasis. *Nutrients* **2018**, *10*, 393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Chavez, J.A.; Summers, S.A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *419*, 101–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Guduz, T.I.; Tserng, K.Y.; Hoppel, C.L. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24154–24158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Pinton, P.; Ferrari, D.; Rapizzi, E.; Di Virgilio, F.; Pozzan, T.; Rizzuto, R. The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: Significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.* **2001**, *20*, 2690–2701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Amati, F.; Dube, J.J.; Alvarez-Carnero, E.; Edreira, M.M.; Chomentowski, P.; Coen, P.M.; Switzer, G.E.; Bickel, P.E.; Stefanovic-Racic, M.; Toledo, F.G.; et al. Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: Another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes* **2011**, *60*, 2588–2597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chung, J.O.; Koutsari, C.; Blachnio-Zabielska, A.U.; Hames, K.C.; Jensen, M.D. Effects of meal ingestion on intramyocellular ceramide concentrations and fractional de novo synthesis in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Engin, A.B. What Is Lipotoxicity? *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *960*, 197–220. [[PubMed](#)]
8. Turpin, S.M.; Nicholls, H.T.; Willmes, D.M.; Mourier, A.; Brodesser, S.; Wunderlich, C.M.; Mauer, J.; Xu, E.; Hammerschmidt, P.; Bronneke, H.S.; et al. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 678–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ter Horst, K.W.; Gilijamse, P.W.; Versteeg, R.I.; Ackermans, M.T.; Nederveen, A.J.; la Fleur, S.E.; Romijn, J.A.; Nieuwdorp, M.; Zhang, D.; Samuel, V.T.; et al. Hepatic diacylglycerol-associated protein kinase epsilon translocation links hepatic steatosis to hepatic insulin resistance in humans. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 1997–2004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Petersen, M.C.; Madiraju, A.K.; Gassaway, B.M.; Marcel, M.; Nasiri, A.R.; Butrico, G.; Marcucci, M.J.; Zhang, D.; Abulizi, A.; Zhang, X.M.; et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 4361–4371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Shi, H.; Kokoeva, M.V.; Inouye, K.; Tzameli, I.; Yin, H.; Flier, J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 3015–3025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Vandanmagsar, B.; Youm, Y.H.; Ravussin, A.; Galgani, J.E.; Stadler, K.; Mynatt, R.L.; Ravussin, E.; Stephens, J.M.; Dixit, V.D. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 179–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ueda, N. Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: A role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 5076–5124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Trajkovic, K.; Hsu, C.; Chiantia, S.; Rajendran, L.; Wenzel, D.; Wieland, F.; Schwille, P.; Brugger, B.; Simons, M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **2008**, *319*, 1244–1247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Morvan, J.; Rinaldi, B.; Friant, S. Pkh1/2-dependent phosphorylation of Vps27 regulates ESCRT-I recruitment to endosomes. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 4054–4064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kumar, D.; Gupta, D.; Shankar, S.; Srivastava, R.K. Biomolecular characterization of exosomes released from cancer stem cells: Possible implications for biomarker and treatment of cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 3280–3291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Abou-Ghali, M.; Stiban, J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22*, 760–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ganesan, V.; Perera, M.N.; Colombini, D.; Datskovskiy, D.; Chadha, K.; Colombini, M. Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis* **2010**, *15*, 553–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ponnusamy, S.; Meyers-Needham, M.; Senkal, C.E.; Saddoughi, S.A.; Sentelle, D.; Selvam, S.P.; Salas, A.; Ogretmen, B. Sphingolipids and cancer: Ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol.* **2010**, *6*, 1603–1624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Che, J.; Huang, Y.; Xu, C.; Zhang, P. Increased ceramide production sensitizes breast cancer cell response to chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, *79*, 933–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kumari, M.; Wang, X.; Lantier, L.; Lyubetskaya, A.; Eguchi, J.; Kang, S.; Tenen, D.; Roh, H.C.; Kong, X.; Kazak, L.; et al. IRF3 promotes adipose inflammation and insulin resistance and represses browning. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 2839–2854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Garcia-Gonzalez, V.; Gutierrez-Quintanar, N.; Mas-Oliva, J. The C-terminal Domain Supports a Novel Function for CETPI as a New Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Hanada, K.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Yamaji, T. CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1791*, 684–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Leonardini, A.; D’Oria, R.; Incalza, M.A.; Caccioppoli, C.; Buccheri, V.A.; Cignarelli, A.; Paparella, D.; Margari, V.; Natalicchio, A.; Perrini, S.; et al. GLP-1 receptor activation inhibits palmitate induced apoptosis via ceramide in human cardiac progenitor cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Crivelli, S.M.; Paulus, A.; Markus, J.; Bauwens, M.; Berkes, D.; de Vries, H.E.; Mulder, M.T.; Walter, J.; Mottaghy, F.M.; Losen, M.; et al. Synthesis, radiosynthesis, and preliminary in vitro and in vivo evaluation of the fluorinated ceramide trafficking inhibitor (HPA-12) for brain applications. *J. Alzheimers Dis.* **2017**, *60*, 783–794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mullen, T.D.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* **2012**, *441*, 789–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kraveka, J.M.; Li, L.; Szulc, Z.M.; Bielawski, J.; Ogretmen, B.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.M.; Bielawska, A. Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16718–16728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Raichur, S.; Wang, S.T.; Chan, P.W.; Li, Y.; Ching, J.; Chaurasia, B.; Dogra, S.; Ohman, M.K.; Takeda, K.; Sugii, S.; et al. CerS2 haploinsufficiency inhibits  $\beta$ -oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 687–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Jennemann, R.; Rabionet, M.; Gorgas, K.; Epstein, S.; Dalpke, A.; Rothermel, U.; Bayerle, A.; van der Hoeven, F.; Imgrund, S.; Kirsch, J.; et al. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 586–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kitatani, K.; Idkowiak-Baldys, J.; Hannun, Y.A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* **2008**, *20*, 1010–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Takeda, S.; Mitsutake, S.; Tsuji, K.; Igarashi, Y. Apoptosis occurs via the ceramide recycling pathway in human HaCaT keratinocytes. *J. Biochem.* **2006**, *139*, 255–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Miller, L.G., Jr.; Young, J.A.; Ray, S.K.; Wang, G.; Purohit, S.; Banik, N.L.; Dasgupta, S. Sphingosine toxicity in EAE and MS: Evidence for ceramide generation via serine-palmitoyltransferase activation. *Neurochem. Res.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pagadala, M.; Kasumov, T.; McCullough, A.J.; Zein, N.N.; Kirwan, J.P. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23*, 365–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ardail, D.; Popa, I.; Bodennec, J.; Louisot, P.; Schmitt, D.; Portoukalian, J. The mitochondria-associated endoplasmic-reticulum subcompartment (MAM fraction) of rat liver contains highly active sphingolipid-specific glycosyltransferases. *Biochem. J.* **2003**, *371*, 1013–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rizzuto, R.; Pinton, P.; Carrington, W.; Fay, F.S.; Fogarty, K.E.; Lifshitz, L.M.; Tuft, R.A.; Pozzan, T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $Ca^{2+}$  responses. *Science* **1998**, *280*, 1763–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Csordas, G.; Renken, C.; Varnai, P.; Walter, L.; Weaver, D.; Buttle, K.F.; Balla, T.; Mannella, C.A.; Hajnoczky, G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 915–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Simmen, T.; Aslan, J.E.; Blagoveshchenskaya, A.D.; Thomas, L.; Wan, L.; Xiang, Y.; Feliciangeli, S.F.; Hung, C.H.; Crump, C.M.; Thomas, G. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* **2005**, *24*, 717–729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Samanta, S.; Stiban, J.; Mangel, T.K.; Colombini, M. Visualization of ceramide channels by transmission electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1196–1201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Seervi, M.; Sobhan, P.K.; Joseph, J.; Ann Mathew, K.; Santhoshkumar, T.R. ERO1 $\alpha$ -dependent endoplasmic reticulum-mitochondrial calcium flux contributes to ER stress and mitochondrial permeabilization by procaspase-activating compound-1 (PAC-1). *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Chung, P.; Harding, H.P.; Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **2000**, *287*, 664–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Hayashi, T.; Su, T.P. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate  $Ca^{2+}$  signaling and cell survival. *Cell* **2007**, *131*, 596–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Hsu, S.Y.; Kaipia, A.; Zhu, L.; Hsueh, A.J. Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11. *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11*, 1858–1867. [[PubMed](#)]
43. Morciano, G.; Marchi, S.; Morganti, C.; Sbrano, L.; Bittremieux, M.; Kerkhofs, M.; Corricelli, M.; Danese, A.; Karkucinska-Wieckowska, A.; Wieckowski, M.R.; et al. Role of Mitochondria-associated ER membranes in calcium regulation in cancer-specific settings. *Neoplasia* **2018**, *20*, 510–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Betz, C.; Stracka, D.; Prescianotto-Baschong, C.; Frieden, M.; Demaurex, N.; Hall, M.N. Feature article: MTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 12526–12534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Myhill, N.; Lynes, E.M.; Nanji, J.A.; Blagoveshchenskaya, A.D.; Fei, H.; Carmine Simmen, K.; Cooper, T.J.; Thomas, G.; Simmen, T. The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 2777–2788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lynes, E.M.; Raturi, A.; Shenkman, M.; Ortiz Sandoval, C.; Yap, M.C.; Wu, J.; Janowicz, A.; Myhill, N.; Benson, M.D.; Campbell, R.E.; et al. Palmitoylation is the switch that assigns calnexin to quality control or ER Ca<sup>2+</sup> signaling. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 3893–3903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Iwasawa, R.; Mahul-Mellier, A.L.; Datler, C.; Pazarentzos, E.; Grimm, S. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J.* **2011**, *30*, 556–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Breckenridge, D.G.; Stojanovic, M.; Marcellus, R.C.; Shore, G.C. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 1115–1127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Diaz-Villanueva, J.F.; Diaz-Molina, R.; Garcia-Gonzalez, V. Protein folding and mechanisms of proteostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 17193–17230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kogot-Levin, A.; Saada, A. Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie* **2014**, *100*, 88–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Bernardi, P.; Scorrano, L.; Colonna, R.; Petronilli, V.; di Lisa, F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 687–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Siskind, L.J.; Davoody, A.; Lewin, N.; Marshall, S.; Colombini, M. Enlargement and contracture of C2-ceramide channels. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1560–1575. [[CrossRef](#)]
53. Lee, H.; Rotolo, J.A.; Mesicek, J.; Penate-Medina, T.; Rimmer, A.; Liao, W.C.; Yin, X.; Ragupathi, G.; Ehleiter, D.; Gulbins, E.; et al. Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Artetxe, I.; Ugarte-Urbe, B.; Gil, D.; Valle, M.; Alonso, A.; Garcia-Saez, A.J.; Goni, F.M. Does ceramide form channels? The ceramide-induced membrane permeabilization mechanism. *Biophys. J.* **2017**, *113*, 860–868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Colombini, M. Ceramide channels and their role in mitochondria-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1797*, 1239–1244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Siskind, L.J.; Colombini, M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38640–38644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Stiban, J.; Fistere, D.; Colombini, M. Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. *Apoptosis* **2006**, *11*, 773–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Sentelle, R.D.; Senkal, C.E.; Jiang, W.; Ponnusamy, S.; Gencer, S.; Selvam, S.P.; Ramshesh, V.K.; Peterson, Y.K.; Lemasters, J.J.; Szulc, Z.M.; et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 831–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *445*, 77–88. [[PubMed](#)]
60. Bollinger, C.R.; Teichgraber, V.; Gulbins, E. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1746*, 284–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Hayashi, T.; Su, T.P. Intracellular dynamics of  $\epsilon$ -1 receptors ( $\epsilon$ -1 binding sites) in NG108-15 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 726–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kutomi, G.; Tamura, Y.; Tanaka, T.; Kajiwara, T.; Kukita, K.; Ohmura, T.; Shima, H.; Takamaru, T.; Satomi, F.; Suzuki, Y.; et al. Human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1- $\alpha$  is a novel predictor for poor prognosis of breast cancer. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 1091–1096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Tanaka, T.; Kutomi, G.; Kajiwara, T.; Kukita, K.; Kochin, V.; Kanaseki, T.; Tsukahara, T.; Hirohashi, Y.; Torigoe, T.; Okamoto, Y.; et al. Cancer-associated oxidoreductase ERO1- $\alpha$  promotes immune escape through up-regulation of PD-L1 in human breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 24706–24718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Van Vliet, A.R.; Giordano, F.; Gerlo, S.; Segura, I.; Van Eygen, S.; Molenberghs, G.; Rocha, S.; Houcine, A.; Derua, R.; Verfaillie, T.; et al. The ER Stress Sensor PERK Coordinates ER-Plasma Membrane Contact Site Formation through Interaction with Filamin-A and F-Actin Remodeling. *Mol. Cell* **2017**, *65*, 885–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Blais, J.D.; Addison, C.L.; Edge, R.; Falls, T.; Zhao, H.; Wary, K.; Koumenis, C.; Harding, H.P.; Ron, D.; Holcik, M.; et al. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 9517–9532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Teng, Y.; Ren, X.; Li, H.; Shull, A.; Kim, J.; Cowell, J.K. Mitochondrial ATAD3A combines with GRP78 to regulate the WASF3 metastasis-promoting protein. *Oncogene* **2016**, *35*, 333–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Issop, L.; Fan, J.; Lee, S.; Rone, M.B.; Basu, K.; Mui, J.; Papadopoulos, V. Mitochondria-associated membrane formation in hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis: Role of ATAD3. *Endocrinology* **2015**, *156*, 334–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Van Vliet, A.R.; Verfaillie, T.; Agostinis, P. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2253–2262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Szymanski, J.; Janikiewicz, J.; Michalska, B.; Patalas-Krawczyk, P.; Perrone, M.; Ziolkowski, W.; Duszynski, J.; Pinton, P.; Dobrzyn, A.; Wieckowski, M.R. Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Karczmarek-Borowska, B.; Filip, A.; Wojcierowski, J.; Smolen, A.; Korobowicz, E.; Korszen-Pilecka, I.; Zdunek, M. Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2006**, *51*, 61–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Malkinson, A.M. Molecular comparison of human and mouse pulmonary adenocarcinomas. *Exp. Lung Res.* **1998**, *24*, 541–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Park, D.; Magis, A.T.; Li, R.; Owonikoko, T.K.; Sica, G.L.; Sun, S.Y.; Ramalingam, S.S.; Khuri, F.R.; Curran, W.J.; Deng, X. Novel small-molecule inhibitors of Bcl-xL to treat lung cancer. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 5485–5496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Huang, H.; Shah, K.; Bradbury, N.A.; Li, C.; White, C. Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake and reactive oxygen species generation. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Patra, K.C.; Wang, Q.; Bhaskar, P.T.; Miller, L.; Wang, Z.; Wheaton, W.; Chandel, N.; Laakso, M.; Muller, W.J.; Allen, E.L.; et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 213–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Wolf, A.; Agnihotri, S.; Micallef, J.; Mukherjee, J.; Sabha, N.; Cairns, R.; Hawkins, C.; Guha, A. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 313–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Beckert, S.; Farrahi, F.; Aslam, R.S.; Scheuenstuhl, H.; Konigsrainer, A.; Hussain, M.Z.; Hunt, T.K. Lactate stimulates endothelial cell migration. *Wound Repair Regen.* **2006**, *14*, 321–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Kim, J.W.; Tchernyshyov, I.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 177–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Papandreou, I.; Cairns, R.A.; Fontana, L.; Lim, A.L.; Denko, N.C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 187–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Raturi, A.; Simmen, T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 213–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Bittremieux, M.; Parys, J.B.; Pinton, P.; Bultynck, G. ER functions of oncogenes and tumor suppressors: Modulators of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1863*, 1364–1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

81. Ma, L.I.; Chang, Y.; Yu, L.; He, W.; Liu, Y. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via PI3K/Akt signaling in breast cancer cells. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 3816–3822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Herrera-Cruz, M.S.; Simmen, T. Cancer: Untethering mitochondria from the endoplasmic reticulum? *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Patergnani, S.; Missiroli, S.; Marchi, S.; Giorgi, C. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes microenvironment: Targeting autophagic and apoptotic pathways in cancer therapy. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Bieberich, E. Ceramide signaling in cancer and stem cells. *Future Lipidol.* **2008**, *3*, 273–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Morad, S.A.; Cabot, M.C. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 51–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Paschall, A.V.; Zimmerman, M.A.; Torres, C.M.; Yang, D.; Chen, M.R.; Li, X.; Bieberich, E.; Bai, A.; Bielawski, J.; Bielawska, A.; et al. Ceramide targets XIAP and cIAP1 to sensitize metastatic colon and breast cancer cells to apoptosis induction to suppress tumor progression. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Haynes, T.A.; Filippov, V.; Filippova, M.; Yang, J.; Zhang, K.; Duerksen-Hughes, P.J. DNA damage induces down-regulation of UDP-glucose ceramide glucosyltransferase, increases ceramide levels and triggers apoptosis in p53-deficient cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 943–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Zhang, X.; Li, B.; Zhang, Y.; Liu, J. Ceramide induces release of mitochondrial proapoptotic proteins in caspase-dependent and -independent manner in HT-29 cells. *Sci. China Life Sci.* **2008**, *51*, 66–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Liu, Y.Y.; Hill, R.A.; Li, Y.T. Ceramide glycosylation catalyzed by glucosylceramide synthase and cancer drug resistance. *Adv. Cancer Res.* **2013**, *117*, 59–89. [[PubMed](#)]
90. Moro, K.; Kawaguchi, T.; Tsuchida, J.; Gabriel, E.; Qi, Q.; Yan, L.; Wakai, T.; Takabe, K.; Nagahashi, M. Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. *Oncotarget* **2018**, *9*, 19874–19890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Roh, J.L.; Kim, E.H.; Park, J.Y.; Kim, J.W. Inhibition of glucosylceramide synthase sensitizes head and neck cancer to cisplatin. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1907–1915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Roh, J.L.; Park, J.Y.; Kim, E.H.; Jang, H.J. Targeting acid ceramidase sensitises head and neck cancer to cisplatin. *Eur. J. Cancer* **2016**, *52*, 163–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Henry, B.; Moller, C.; Dimanche-Boitrel, M.T.; Gulbins, E.; Becker, K.A. Targeting the ceramide system in cancer. *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 286–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Schiffmann, S.; Sandner, J.; Birod, K.; Wobst, I.; Angioni, C.; Ruckhaberle, E.; Kaufmann, M.; Ackermann, H.; Lotsch, J.; Schmidt, H.; et al. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 745–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Nagahashi, M.; Tsuchida, J.; Moro, K.; Hasegawa, M.; Tatsuda, K.; Woelfel, I.A.; Takabe, K.; Wakai, T. High levels of sphingolipids in human breast cancer. *J. Surg. Res.* **2016**, *204*, 435–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Flowers, M.; Fabrias, G.; Delgado, A.; Casas, J.; Abad, J.L.; Cabot, M.C. C6-ceramide and targeted inhibition of acid ceramidase induce synergistic decreases in breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *133*, 447–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Vethakanraj, H.S.; Babu, T.A.; Sudarsanan, G.B.; Duraisamy, P.K.; Ashok Kumar, S. Targeting ceramide metabolic pathway induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *464*, 833–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Ogretmen, B.; Hannun, Y.A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 604–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Guan, F.; Handa, K.; Hakomori, S.I. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7461–7466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Ghosal, P.; Sukocheva, O.A.; Wang, T.; Mayne, G.C.; Watson, D.I.; Hussey, D.J. Effects of chemotherapy agents on Sphingosine-1-Phosphate receptors expression in MCF-7 mammary cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *81*, 218–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Bose, R.; Verheij, M.; Haimovitz-Friedman, A.; Scotto, K.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: An alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **1995**, *82*, 405–414. [[CrossRef](#)]

102. Kim, E.S.; Kim, J.S.; Kim, S.G.; Hwang, S.; Lee, C.H.; Moon, A. Sphingosine 1-phosphate regulates matrix metalloproteinase-9 expression and breast cell invasion through S1P3-Gαq coupling. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 2220–2230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Nistico, P.; Bissell, M.J.; Radisky, D.C. Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a011908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Mathow, D.; Chessa, F.; Rabionet, M.; Kaden, S.; Jennemann, R.; Sandhoff, R.; Grone, H.J.; Feuerborn, A. Zeb1 affects epithelial cell adhesion by diverting glycosphingolipid metabolism. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 321–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Edmond, V.; Dufour, F.; Poiroux, G.; Shoji, K.; Malleter, M.; Fouque, A.; Tauzin, S.; Rimokh, R.; Sergent, O.; Penna, A.; et al. Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. *Oncogene* **2015**, *34*, 996–1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Levy, M.; Futerman, A.H. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 347–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Bleicher, R.J.; Cabot, M.C. Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1585*, 172–178. [[CrossRef](#)]
109. Grosch, S.; Schiffmann, S.; Geisslinger, G. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 50–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Bornancin, F. Ceramide kinase: The first decade. *Cell Signal.* **2011**, *23*, 999–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Gomez-Munoz, A. Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 2049–2056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Kim, C.W.; Lee, H.M.; Lee, T.H.; Kang, C.; Kleinman, H.K.; Gho, Y.S. Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6312–6317. [[PubMed](#)]
113. Paik, J.H.; Chae, S.; Lee, M.J.; Thangada, S.; Hla, T. Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of αvβ3- and β1-containing integrins. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11830–11837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Wang, F.; Van Brocklyn, J.R.; Hobson, J.P.; Movafagh, S.; Zukowska-Grojec, Z.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a Gi-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35343–35350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Haakenson, J.K.; Khokhlatchev, A.V.; Choi, Y.J.; Linton, S.S.; Zhang, P.; Zaki, P.M.; Fu, C.; Cooper, T.K.; Manni, A.; Zhu, J.; et al. Lysosomal degradation of CD44 mediates ceramide nanoliposome-induced anoikis and diminished extravasation in metastatic carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 8632–8643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Sarkar, S.; Maceyka, M.; Hait, N.C.; Paugh, S.W.; Sankala, H.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5313–5317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Sukocheva, O.; Wadham, C.; Holmes, A.; Albanese, N.; Verrier, E.; Feng, F.; Bernal, A.; Derian, C.K.; Ullrich, A.; Vadas, M.A.; et al. Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: The role of sphingosine kinase-1. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 301–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Fan, S.H.; Wang, Y.Y.; Lu, J.; Zheng, Y.L.; Wu, D.M.; Zhang, Z.F.; Shan, Q.; Hu, B.; Li, M.Q.; Cheng, W. CERS2 suppresses tumor cell invasion and is associated with decreased V-ATPase and MMP-2/MMP-9 activities in breast cancer. *J. Cell Biochem.* **2015**, *116*, 502–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Van Brocklyn, J.R.; Young, N.; Roof, R. Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* **2003**, *199*, 53–60. [[CrossRef](#)]
120. Wu, H.X.; Wang, G.M.; Lu, X.; Zhang, L. miR-542-3p targets sphingosine-1-phosphate receptor 1 and regulates cell proliferation and invasion of breast cancer cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21*, 108–114. [[PubMed](#)]
121. Filipenko, I.; Schwalm, S.; Reali, L.; Pfeilschifter, J.; Fabbro, D.; Huwiler, A.; Zangemeister-Wittke, U. Upregulation of the S1P3 receptor in metastatic breast cancer cells increases migration and invasion by induction of PGE2 and EP2/EP4 activation. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1861*, 1840–1851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

122. Gril, B.; Paranjape, A.N.; Woditschka, S.; Hua, E.; Dolan, E.L.; Hanson, J.; Wu, X.; Kloc, W.; Izycka-Swieszewska, E.; Duchnowska, R.; et al. Reactive astrocytic S1P3 signaling modulates the blood-tumor barrier in brain metastases. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Hu, W.; Tan, C.; He, Y.; Zhang, G.; Xu, Y.; Tang, J. Functional miRNAs in breast cancer drug resistance. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 1529–1541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Galindo-Hernandez, O.; Villegas-Comonfort, S.; Candanedo, F.; Gonzalez-Vazquez, M.C.; Chavez-Ocana, S.; Jimenez-Villanueva, X.; Sierra-Martinez, M.; Salazar, E.P. Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients. *Arch. Med. Res.* **2013**, *44*, 208–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Galindo-Hernandez, O.; Gonzales-Vazquez, C.; Cortes-Reynosa, P.; Reyes-Uribe, E.; Chavez-Ocana, S.; Reyes-Hernandez, O.; Sierra-Martinez, M.; Salazar, E.P. Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biol.* **2015**, *36*, 9649–9659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Xu, J.; Camfield, R.; Gorski, S.M. The interplay between exosomes and autophagy—Partners in crime. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, jcs215210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Al-Nedawi, K.; Meehan, B.; Micallef, J.; Lhotak, V.; May, L.; Guha, A.; Rak, J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 619–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Shedden, K.; Xie, X.T.; Chandaroy, P.; Chang, Y.T.; Rosania, G.R. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: Association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4331–4337. [[PubMed](#)]
129. Safaei, R.; Larson, B.J.; Cheng, T.C.; Gibson, M.A.; Otani, S.; Naerdemann, W.; Howell, S.B. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1595–1604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Rilla, K.; Mustonen, A.M.; Arasu, U.T.; Harkonen, K.; Matilainen, J.; Nieminen, P. Extracellular vesicles are integral and functional components of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T.L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Tesic Mark, M.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **2015**, *527*, 329–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Weidle, U.H.; Dickopf, S.; Hintermair, C.; Kollmorgen, G.; Birzele, F.; Brinkmann, U. The role of micro RNAs in breast cancer metastasis: preclinical validation and potential therapeutic targets. *Cancer Genom. Proteom.* **2018**, *15*, 17–39.
133. Galindo-Hernandez, O.; Serna-Marquez, N.; Castillo-Sanchez, R.; Salazar, E.P. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2014**, *91*, 299–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Choi, D.S.; Kim, D.K.; Kim, Y.K.; Gho, Y.S. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* **2013**, *13*, 1554–1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Record, M.; Carayon, K.; Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 108–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. El Buri, A.; Adams, D.R.; Smith, D.; Tate, R.J.; Mullin, M.; Pyne, S.; Pyne, N.J. The sphingosine 1-phosphate receptor 2 is shed in exosomes from breast cancer cells and is N-terminally processed to a short constitutively active form that promotes extracellular signal regulated kinase activation and DNA synthesis in fibroblasts. *Oncotarget* **2018**, *9*, 29453–29467. [[PubMed](#)]
137. Karliner, J.S. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in the heart: A decade of progress. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1831*, 203–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Tran-Dinh, A.; Diallo, D.; Delbosc, S.; Varela-Perez, L.M.; Dang, Q.B.; Lapergue, B.; Burillo, E.; Michel, J.B.; Levoye, A.; Martin-Ventura, J.L.; et al. HDL and endothelial protection. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 493–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Denimal, D.; Pais de Barros, J.P.; Petit, J.M.; Bouillet, B.; Verges, B.; Duvillard, L. Significant abnormalities of the HDL phosphosphingolipidome in type 1 diabetes despite normal HDL cholesterol concentration. *Atherosclerosis* **2015**, *241*, 752–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Liu, M.; Seo, J.; Allegood, J.; Bi, X.; Zhu, X.; Boudyguina, E.; Gebre, A.K.; Avni, D.; Shah, D.; Sorci-Thomas, M.G.; et al. Hepatic apolipoprotein M (apoM) overexpression stimulates formation of

- larger apoM/sphingosine 1-phosphate-enriched plasma high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 2801–2814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Alemany, R.; van Koppen, C.J.; Danneberg, K.; Ter Braak, M.; Meyer Zu Heringdorf, D. Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2007**, *374*, 413–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  142. Jin, F.; Hagemann, N.; Sun, L.; Wu, J.; Doeppner, T.R.; Dai, Y.; Hermann, D.M. High-density lipoprotein (HDL) promotes angiogenesis via S1P3-dependent VEGFR2 activation. *Angiogenesis* **2018**, *21*, 381–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  143. Benaud, C.; Oberst, M.; Hobson, J.P.; Spiegel, S.; Dickson, R.B.; Lin, C.Y. Sphingosine 1-phosphate, present in serum-derived lipoproteins, activates matriptase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10539–10546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  144. Kang, J.Y.; Dolled-Filhart, M.; Ocal, I.T.; Singh, B.; Lin, C.Y.; Dickson, R.B.; Rimm, D.L.; Camp, R.L. Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1101–1105. [[PubMed](#)]
  145. Sales, K.U.; Friis, S.; Konkel, J.E.; Godiksen, S.; Hatakeyama, M.; Hansen, K.K.; Rogatto, S.R.; Szabo, R.; Vogel, L.K.; Chen, W.; et al. Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven pre-malignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis. *Oncogene* **2015**, *34*, 346–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  146. Ko, C.J.; Huang, C.C.; Lin, H.Y.; Juan, C.P.; Lan, S.W.; Shyu, H.Y.; Wu, S.R.; Hsiao, P.W.; Huang, H.P.; Shun, C.T.; et al. Androgen-induced TMPRSS2 activates matriptase and promotes extracellular matrix degradation, prostate cancer cell invasion, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2949–2960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  147. Tsai, C.H.; Teng, C.H.; Tu, Y.T.; Cheng, T.S.; Wu, S.R.; Ko, C.J.; Shyu, H.Y.; Lan, S.W.; Huang, H.P.; Tzeng, S.F.; et al. HAI-2 suppresses the invasive growth and metastasis of prostate cancer through regulation of matriptase. *Oncogene* **2014**, *33*, 4643–4652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  148. Rather, G.M.; Lin, S.Y.; Lin, H.; Banach-Petrosky, W.; Hirshfield, K.M.; Lin, C.Y.; Johnson, M.D.; Szekely, Z.; Bertino, J.R. Activated matriptase as a target to treat breast cancer with a drug conjugate. *Oncotarget* **2018**, *9*, 25983–25992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  149. Wu, T.; Wang, X.; Li, J.; Song, X.; Wang, Y.; Zhang, L.; Li, Z.; Tian, J. Identification of personalized chemoresistance genes in subtypes of basal-like breast cancer based on functional differences using pathway analysis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  150. Schwentner, L.; Wolters, R.; Koretz, K.; Wischnewsky, M.B.; Kreienberg, R.; Rottscholl, R.; Wockel, A. Triple-negative breast cancer: The impact of guideline-adherent adjuvant treatment on survival—A retrospective multi-centre cohort study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *132*, 1073–1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  151. Loi, S.; Pommey, S.; Haibe-Kains, B.; Beavis, P.A.; Darcy, P.K.; Smyth, M.J.; Stagg, J. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 11091–11096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  152. Elnashar, A.T.; Ali el, S.M.; Gaber, A. The prognostic value of triple negative in stage II/III breast cancer. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **2012**, *18*, 68–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  153. Nadal, R.; Ortega, F.G.; Salido, M.; Lorente, J.A.; Rodriguez-Rivera, M.; Delgado-Rodriguez, M.; Macia, M.; Fernandez, A.; Corominas, J.M.; Garcia-Puche, J.L.; et al. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: Potential role in resistance to chemotherapy. *Int. J. Cancer* **2013**, *133*, 2398–2407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  154. Desai, S.; Liu, Z.; Yao, J.; Patel, N.; Chen, J.; Wu, Y.; Ahn, E.E.; Fodstad, O.; Tan, M. Heat shock factor 1 (HSF1) controls chemoresistance and autophagy through transcriptional regulation of autophagy-related protein 7 (ATG7). *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 9165–9176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  155. Beelen, K.; Hoefnagel, L.D.; Opdam, M.; Wesseling, J.; Sanders, J.; Vincent, A.D.; van Diest, P.J.; Linn, S.C. PI3K/AKT/mTOR pathway activation in primary and corresponding metastatic breast tumors after adjuvant endocrine therapy. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 1257–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  156. Zhang, X.; Wu, X.; Su, P.; Gao, Y.; Meng, B.; Sun, Y.; Li, L.; Zhou, Z.; Zhou, G. Doxorubicin influences the expression of glucosylceramide synthase in invasive ductal breast cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

157. Gouaze, V.; Yu, J.Y.; Bleicher, R.J.; Han, T.Y.; Liu, Y.Y.; Wang, H.; Gottesman, M.M.; Bitterman, A.; Giuliano, A.E.; Cabot, M.C. Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 633–639. [[PubMed](#)]
158. Gouaze-Andersson, V.; Yu, J.Y.; Kreitenberg, A.J.; Bielawska, A.; Giuliano, A.E.; Cabot, M.C. Ceramide and glucosylceramide upregulate expression of the multidrug resistance gene MDR1 in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1771*, 1407–1417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Liu, Y.Y.; Gupta, V.; Patwardhan, G.A.; Bhinge, K.; Zhao, Y.; Bao, J.; Mehendale, H.; Cabot, M.C.; Li, Y.T.; Jazwinski, S.M. Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and  $\beta$ -catenin signaling. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Liu, J.; Zhang, X.; Liu, A.; Zhang, D.; Su, Y.; Liu, Y.; You, D.; Yuan, L.; Kong, X.; Wang, X.; et al. Altered methylation of glucosylceramide synthase promoter regulates its expression and associates with acquired multidrug resistance in invasive ductal breast cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 36755–36766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Bekele, R.T.; Venkatraman, G.; Liu, R.Z.; Tang, X.; Mi, S.; Benesch, M.G.; Mackey, J.R.; Godbout, R.; Curtis, J.M.; McMullen, T.P.; et al. Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: Implications for tamoxifen therapy and resistance. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Morad, S.A.; Cabot, M.C. Tamoxifen regulation of sphingolipid metabolism—Therapeutic implications. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851*, 1134–1145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Jaafar, R.; Mnich, K.; Dolan, S.; Hillis, J.; Almanza, A.; Logue, S.E.; Samali, A.; Gorman, A.M. RIP2 enhances cell survival by activation of NF- $\kappa$ B in triple negative breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *497*, 115–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).