

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI



**Interacciones lipídicas sobre la amilina, implicaciones
sobre la citotoxicidad de las células beta**

TESIS

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

PRESENTA

Angel Armando Pulido Capiz

Director de Tesis

Dr. Víctor Guadalupe García González

FEBRERO DE 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

“Interacciones lipídicas sobre la amilina, implicaciones sobre la citotoxicidad de las células beta”.

Autor de la Tesis:

Angel Armando Pulido Capiz

Tutor y Director de Tesis

Dr. en C. Víctor Guadalupe García González

Profesor-Investigador

Facultad de Medicina Mexicali, UABC

Mexicali, Baja California

Asesor

Comité de Tesis

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

Dr. Ignacio Rivero Espejel, Centro de Graduados e Investigación en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana.

Dr. Iván Córdova Guerrero, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

Mexicali, B.C., a ___ de Enero de 2018.

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del documento escrito denominado: *INTERACCIONES LIPÍDICAS SOBRE LA AMILINA, IMPLICACIONES SOBRE LA CITOTOXICIDAD DE LAS CÉLULAS BETA*, que para obtener el GRADO de MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD presenta *Angel Armando Pulido Capiz*.

Realizada la evaluación resolvimos: Aprobar el documento

Dr. Victor Guadalupe Garcia González
Presidente

Dr. Raúl Díaz Molina
Secretario

Dr. Ignacio Rivero Espejel
Sinodal

Dr. Iván Córdoba Guerrero
Sinodal

Contenido de la Presentación.

0	Resumen.....	1
1	Antecedentes.....	2
1.1	Metabolismo de la amilina.....	2
1.2	Estructura y función de las estructuras amiloides.....	3
1.3	Interacción lípidos con amiloides.....	7
2	Justificación.....	9
3	Planteamiento del problema.....	9
4	Hipótesis.....	10
5	Hipótesis Nula.....	10
6	Objetivo General.....	10
7	Objetivos específicos.....	11
8	Variables.....	11
9	Materiales y métodos.....	12
9.1	Preparación de lípidos.....	12
9.1.1	Ácido lisofosfatídico.....	12
9.1.2	Fosfatidilcolina.....	12
9.1.3	Vesículas de fosfatidilcolina con ácido oleico.....	13
9.1.4	Micelas de fosfatidilcolina con ácido palmítico.....	13
9.2	Preparación de péptidos.....	14
9.3	Mediciones espectrofotométricas.....	15
9.3.1	Preparación de las muestras.....	15
9.3.2	Caracterización del enlace peptídico.....	15
9.3.3	Mediciones con rojo Congo a 494nm.....	16
9.3.4	Caracterización por fluorescencia.....	16
9.4	Ensayos celulares.....	16
9.4.1	Ensayo de reducción de MTT.....	17
9.4.2	Caracterización de proteínas por Western blot.....	17
9.5	Análisis in silico.....	18
9.5.1	Análisis de secuencias.	18
9.5.2	Parámetros fisicoquímicos.....	18
9.5.3	Caracterización de la propensión a la agregación.....	18
9.5.4	Secuencias diseñadas de novo.	20
10	Resultados.....	20
10.1	Análisis in silico.....	20
10.2	Modulación de la amilina mediada por el ácido lisofosfatídico.....	25
10.3	Interacción de la fosfatidilcolina y los segmentos de la amilina.....	28
10.4	Interacciones de la amilina con vesículas de ácido palmítico y oleico....	30
10.5	Interacción de la variante F ₂₃ R y C-terminal.....	33
11	Discusión.....	37
12	Conclusiones.....	39
13	Referencias.....	40
14	Anexos.....	43

Abreviaturas

AGL	Ácidos grasos libres.
C-ter	Segmento carboxilo terminal (²³ FGAILSSTNVGSNTY ³⁷) .
DM2	Diabetes mellitus tipo 2.
F ₂₃ R	Modificación del segmento carboxilo (²³ RGAILSSTNVGSNTY ³⁷) .
IAPP	Polipéptido amiloide de los Islotes o amilina.
LPA	Ácido lisofosfatídico.
N-ter	Segmento amino terminal (¹ KCNTATCATQRLANFLVHSS ²⁰).
OA	Ácido oleico.
PC	Fosfatidilcolina.
PA	Ácido palmítico.
PS	Fosfatidilserina.
RE	Retículo endoplásmico.
ThT	Tioflavina T.
UPR	Vía de respuesta a proteínas desplegadas.

Interacciones lipídicas sobre la amilina, implicaciones sobre la citotoxicidad de las células beta.

Resumen

La amilina o polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) es un péptido desordenado en estado monomérico sintetizado en el retículo endoplásmico (RE) de las células- β pancreáticas, siendo co-secretada junto a la insulina en respuesta a los estímulos que desencadenan su liberación. La amilina participa en diversas funciones, como la regulación del vaciado gástrico, la homeostasis de la glucosa y en la supresión de la liberación de glucagón, además de ser descrito como un sensibilizador de la acción de la leptina. A pesar de que los mecanismos asociados con la formación de estructuras de tipo amiloide en la IAPP no están completamente dilucidados, la evidencia experimental sugiere que los fenómenos de agregación y la formación de fibras amiloides pueden inducir la pérdida de la homeostasis en las células beta, condición asociada directamente con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Así mismo, niveles elevados de ácidos grasos libres (AGL) pueden contribuir a disfunción de las células- β en la DM2 al causar la distensión del RE, condición que ha demostrado inducir estrés de RE. Por lo tanto, el efecto deletéreo de los ácidos grasos (lipotoxicidad) puede desempeñar un papel crítico en los mecanismos patológicos dentro de las células- β . En este trabajo, mediante un estudio *in-sillico* conformado por 240 secuencias de amilina de diferentes especies, permitió caracterizar el comportamiento estructural de la amilina y diseñar análogos con menor propensión a la agregación. A su vez, para dilucidar las interacciones entre lípidos y la amilina, se utilizaron técnicas espectrofotométricas y bioquímicas, que permiten caracterizar los cambios estructurales dependientes de lípidos. Por una parte, los resultados permitieron caracterizar la modulación por parte del ácido lisofosfatídico (LPA), al interaccionar con el segmento carboxilo de la amilina, asimismo se demostró que el ácido palmítico provoca una respuesta positiva al estimular la formación de estructuras de tipo amiloide. Por otra parte, al interaccionar el ácido oleico con el segmento carboxilo terminal no presentó el mismo comportamiento, denotando la capacidad de los lípidos para modificar su estructura secundaria. Además, para conocer las posibles implicaciones sobre la homeostasis de las

células- β , se realizaron ensayos de viabilidad celular, así como la caracterización de algunos factores de transcripción como CHOP, ATF6- α y XBP1s, asociados con el estrés de RE, además de proteínas asociadas con la conservación de la homeostasis metabólica como el transportador ABCA1 y PMCA, las cuales participan en la regulación del colesterol en la membrana y la concentración del calcio, respectivamente. Los datos indican una posible regulación de la expresión de PMCA, así como un aumento en la expresión de CHOP, al ser estimuladas principalmente con el segmento carboxilo terminal. Sin embargo también se observó que al estar presente el estímulo de manera conjunta, C-ter y la variante F23R obtenida de los estudios *in silico*, se puede inhibir el proceso citotóxico inducido por la agregación del C-ter. De manera que en su conjunto, los resultados del presente trabajo permiten proponer nuevas estrategias farmacológicas en el campo de la amilina, para modular los procesos de agregación anómala.

1 Antecedentes.

1.1 Metabolismo de la amilina

Existen diversas enfermedades crónico-degenerativas que están asociadas con el plegamiento anómalo de proteínas y la formación de agregados tóxicos, como lo es la formación de fibras amiloides en los islotes de Langerhans ha sido descrita como una condición patológica asociada con la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Por lo tanto, bajo esta condición, se ve disminuida la función de las células beta así como la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos. Los depósitos de fibras amiloides están compuestos principalmente por la amilina, la cual es un péptido desordenado en estado monomérico con una longitud de 37 residuos en su forma madura. La amilina se produce en el retículo endoplásmico (RE) por las células- β pancreáticas, y posteriormente es procesada en el aparato de Golgi y en los gránulos de secreción de la insulina, de tal manera que es co-secretada como respuesta a los estímulos que desencadenan la liberación de insulina. La amilina

plasmática madura se origina a partir de la preproamilina, compuesta por 89 aminoácidos (1), y posteriormente es modificada en el RE a través de corte proteolítico, entre el enlace de los residuos de arginina-lisina lo cual origina la pérdida de 11 residuos en la sección N-terminal, y de 19 en la región C-terminal.

La amilina participa en el control del vaciado gástrico, la homeostasis de la glucosa y en la supresión de la liberación del glucagón, además ha sido descrita como un sensibilizador de la leptina (2), por lo que está involucrada en el control de la saciedad (3-5), ejerciendo su efecto anorexigénico en el área postrema del sistema nervioso central (3). En pacientes sanos, la concentración basal de amilina varía de 2-13 pmol/L y en el periodo postprandial aumenta de 5-17 pmol/L (6, 7). En pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1), los niveles de amilina se ven disminuidos debido a la disfunción de las células beta (8). Sin embargo, con respecto a los pacientes con DM2, su concentración varía de 1.8-9.8 pmol/L (9), mientras que pacientes con resistencia a la insulina presentan valores superiores a los 20 pmol/L (9).

1.2 Estructura y función de las estructuras amiloides.

La caracterización estructural ha permitido determinar que la amilina tiene el potencial de formar estructuras α -hélices anfipáticas entre los residuos 5-20. Dichas transiciones entre la formación de α -hélices y su agregación, desencadena una gran concentración amiloidogénica en la región C-terminal de la amilina que promueve la formación de láminas- β (10), dando lugar a estructuras fibrilares de tipo amiloide, de manera que este fenómeno de formación de estructura beta, se ha asociado con el desarrollo de la diabetes DM2 (11). Sin embargo, las fibras amiloides maduras no son el principal componente tóxico de las proteínas, se han descrito que las especies moleculares precursoras a su formación, tal es el caso de los oligómeros, pueden ser más tóxicos (12), además de que han sido identificado previamente en proteínas que participan en la unión a lípidos en nuestro grupo de trabajo (12-14).

Así mismo, niveles elevados de ácidos grasos libres (AGL) pueden contribuir a la disfunción de las células- β en la DM2, causando la distensión del RE, el cual provoca estrés de RE, y potencialmente conducir al desarrollo de apoptosis. Así, que el efecto deletéreo de los ácidos grasos (lipotoxicidad), puede desempeñar un papel crítico en los mecanismos patológicos sobre las células- β (15). El correcto funcionamiento de las células- β es crítico debido a la gran carga en la biosíntesis y, el plegamiento de secuencias de proteínas como la insulina, siendo blancos celulares con mayor propensión a presentar estrés de RE (16). Éste es un fenómeno que induce la disfunción y pérdida de masa celular en los islotes, debido a la sobrecarga en su función, que resulta en la aparición de un mecanismo de *respuesta a proteínas desplegadas* (UPR), como mecanismo compensatorio.

Por otra parte, el RE es un orgánulo que presenta un papel importante en la homeostasis celular, específicamente durante el plegamiento de proteínas, la biosíntesis de lípidos, y en el almacenamiento del calcio (17). De tal manera que únicamente las proteínas plegadas correctamente pasan al aparato de Golgi, mientras que las parcialmente plegadas son retenidas en el RE para su plegamiento; sin embargo, si éstas no adquieren su plegamiento nativo son translocadas al citoplasma para su degradación por medio del sistema ubiquitina-proteosoma (18).

En diferentes condiciones de equilibrio, las proteínas desarrollan estados parcialmente plegados, siendo éstos estados intermedios en el proceso, que adoptan estructuras altamente similares a las proteínas correctamente plegadas. Estos intermedios son conocidos como glóbulos fundidos, los cuales tienen la facilidad de adoptar una gran variedad de conformaciones, debido a cambios en las cadenas laterales de los aminoácidos (19), así mismo se ha demostrado que cambios conformacionales a nivel de estructura secundaria en dominios críticos, pueden modular la función proteica (20). Esto se debe a que la estructura de una proteína y su capacidad de llevar a cabo su función están estrechamente relacionadas, de tal forma que los cambios en la estructura nativa podrían producir alteraciones funcionales (14), y eventualmente modificar la homeostasis celular.

Se ha descrito que el estado amiloide de una proteína puede tener una conformación genérica, por lo tanto ser accesible a diferentes secuencias de cadenas polipeptídicas (21), de tal manera que la estructura tridimensional no está codificada por la secuencia de aminoácidos, dando lugar a conformaciones ordenadas, como son las estructuras amiloides. A diferencia de los estados nativos, estas estructuras están altamente empaquetadas y ordenadas debido a que poseen una arquitectura genérica rica en estructuras- β (22-25), proporcionándoles gran estabilidad. Por lo tanto se lleva a cabo un arreglo continuo de puentes de hidrógeno (26), que da lugar a la formación de fibras amiloides, las cuales consisten de estructuras filamentosas sin ramificaciones de algunos nanómetros de diámetro (27).

Sin embargo, se ha descrito que los oligómeros solubles representan la principal conformación tóxica de los amiloides, algunos de estos oligómeros se pueden encontrar en el espacio extracelular o en compartimentos citosólicos, mostrando mecanismos de patogenicidad inicialmente sobre las membranas celulares (Fig. 1) (28). Una de las propuestas que se han sugerido acerca de la citotoxicidad de los oligómeros, es la formación de estructuras similares a canales, en los cuales los oligómeros se internalizan formando un poro en la membrana. De tal manera que los oligómeros pueden permeabilizar la membrana, además de generar una disrupción en la misma por un aumento en la tensión negativa (Fig. 1) (10).

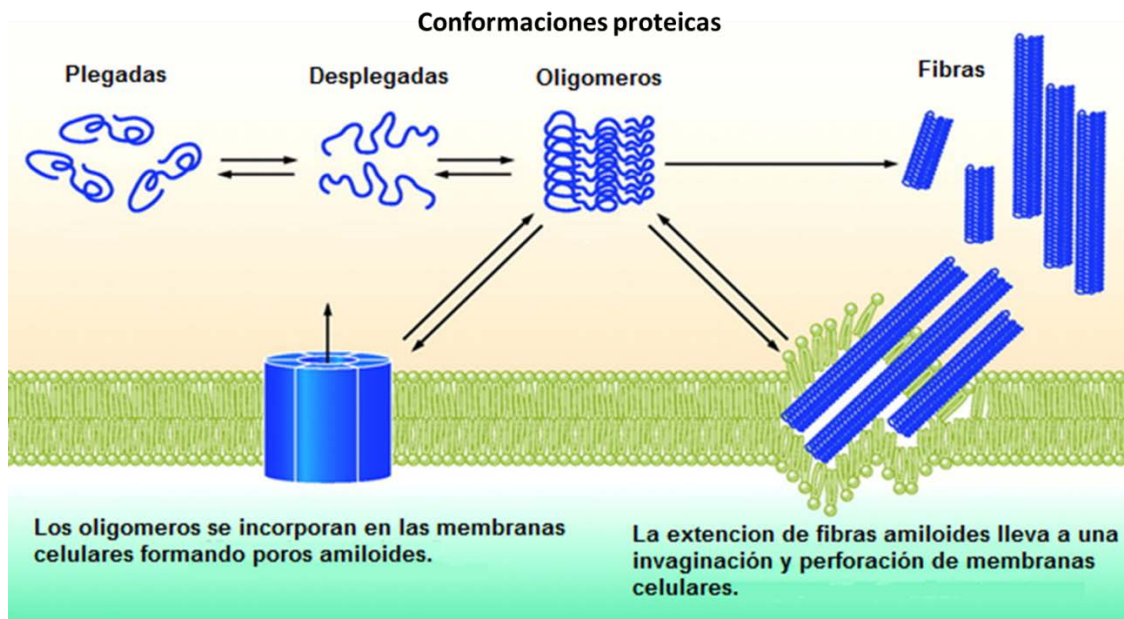


Fig. 1 Interacción de los oligómeros sobre la membrana celular. Se muestra como un plegamiento anómalo puede dar origen a las estructuras oligoméricas, las cuales pueden interaccionar sobre la superficie de la membrana y alterar la estructura. Modificado (10).

De forma muy importante, se han descrito mutaciones que pueden acelerar el proceso de formación de amiloides *in vitro* (10), por ejemplo la mutación de Ser por Gly en la posición 20 que se presenta en poblaciones asiáticas (11), la cual ha sido asociada con casos prematuros de DM2 (6, 8). Además, otro factor que aumenta la formación de estructuras amiloides, es la desaminación de la Asn en la posición 14 de la IAPP. La amilina tiene el potencial de formar hélices anfipáticas entre los residuos 5-20 durante la formación inicial de oligómeros, lo que puede llevar a una asociación entre α -hélices, lo que promueve su agregación. Por lo tanto, la región C-terminal de la amilina posee una gran capacidad amiloidogénica, la cual promueve la formación de láminas- β (11), lo que da como resultado la formación de estructuras amiloides.

Sin embargo, algunas secuencias de amilina de otras especies, como la de la rata, no producen estructuras amiloides *in vivo*; la diferencia entra la amilina humana y la de la rata es de solo cinco aminoácidos, localizados entre los residuos 23-29. En esta región, la secuencia de la rata contiene tres prolinas en las posiciones 25, 28 y 29, condición que interrumpe la formación

de estructuras secundarias helicoidales y disminuye el proceso de nucleación (29). De manera que un enfoque biomimético de la amilina es importante para entender el comportamiento y la estructura de las secuencias de diferentes especies, debido al papel tan importante de la evolución en el diseño de las secuencias optimizadas de las proteínas. Considerando que aún no se ha reportado un análisis extenso de cientos de secuencias, la caracterización de diversas secuencias de amilina puede favorecer un mejor entendimiento de los fenómenos de agregación. Así también, puede ser base para el mejoramiento de secuencias capaces de disminuir la agregación, considerando una optimización fisicoquímica y estructural, lo que a su vez permitirá el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos enfocados en la disminución en, la formación de estructuras β , y complementar el conocimiento de los mecanismos de respuesta celular hacia la amilina y los agregados de tipo amiloide que se forman.

1.3 Interacción lípidos-amiloides de amilina.

Otro factor que se ha descrito promueve la formación de amiloides de amilina bajo condiciones *in vitro* son las membranas aniónicas, debido a que los sistemas altamente cargados tienen un mayor efecto sobre las interacciones péptido-lípido (30). En un modelo más complejo de membranas similar al de las células- β , que carecen de colesterol, se ha observado que esta condición promueve la formación de estructuras amiloides de amilina (31-33); sin embargo, los mecanismos de agregación modulados por fosfolípidos de membrana sobre la amilina no están completamente dilucidados (30, 34, 35). Además, se ha estudiado en diversos péptidos que tienden a formar estructuras amiloides, el papel de los fosfolípidos y del colesterol, de los cuales se ha descrito que en las membranas donde hay presencia de colesterol, podrían acelerar el fenómeno de agregación y la formación de fibras amiloides, tal es el caso del péptido β -amiloide al interaccionar con modelos de membrana con altas concentraciones de colesterol (36).

Adicionalmente se ha reportado en otros péptidos que forman estructuras amiloides, que el colesterol podría ser un factor que puede reducir la formación de este tipo de estructuras, así como disminuir su citotoxicidad

(37). En el caso particular de la IAPP, cuando está en contacto con liposomas de fosfatidilcolina (PC) y colesterol, no muestra un aumento significativo en la agregación. Sin embargo, al introducir colesterol en liposomas aniónicos, éste atenúa la agregación de la amilina causada por la carga negativa del liposoma. Sin embargo no se han realizado este tipo de ensayos en los dominios de mayor agregación de la IAPP.

Por otro lado los niveles elevados de ácidos grasos libres (AGL) pueden contribuir a la disfunción de las células- β en la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (15), causando la distensión del RE, que se ha demostrado podrían provocar estrés de RE, y a su vez podría inducir apoptosis en las células- β . Sin embargo, se ha demostrado que la apoptosis depende del grado de saturación pero no de la longitud de la cadena de ácidos grasos (38). De hecho, las células- β podrían ser más susceptibles a la apoptosis inducida por estearato y palmitato, los cuales son ácidos grasos saturados. Debido a que se ha observado que los ácidos grasos insaturados tienen un efecto protector en contra de la apoptosis, se ha propuesto que podrían proteger de la apoptosis inducida por ácidos grasos saturados. Se ha observado que los ácidos grasos insaturados cumplen con esta función a niveles bajos fisiológicamente, sugiriendo que el efecto antiapoptótico puede ser relevante en modelos *in vivo* (38). Considerando esta condición, y el hecho de que el aumento en los niveles de AGL precede la hiperglicemia en personas obesas que progresan hacia el desarrollo de DM2, se ha considerado que la lipotoxicidad puede ser más relevante que la glucotoxicidad en la patogénesis de las células- β (39).

El correcto funcionamiento de células secretoras es muy importante, tal es el caso de las células- β pancreáticas, las cuales tienen una gran carga en la biosíntesis así como el plegamiento de proteínas, por lo que es más propensa a sufrir estrés de retículo endoplásmico (16), lo cual conduce a la aparición de un mecanismo denominado *respuesta a proteínas desplegadas* (UPR). La vía UPR está compuesta de un sistema de señalización tripartito, que regula la traducción y la transcripción de genes para resolver el estrés o iniciar la apoptosis. En dicha vía, existen tres transductores de señalización que son IRE1, PERK y ATF6, los cuales modulan distintos programas de señalización para aumentar la capacidad de plegamiento de las proteínas, a la vez que

disminuyen la tasa de traducción, condición que reduce la carga de la biosíntesis de proteínas (40).

2 Justificación.

Cabe señalar que los mecanismos asociados con la formación de estructuras amiloides por la IAPP o amilina, aún no están completamente dilucidados. La evidencia sugiere que fenómenos de agregación y la formación de fibras amiloides, pueden inducir la pérdida de la homeostasis en las células beta. Es por ello que es relevante evaluar las posibles interacciones entre la amilina y fosfolípidos estructurales de la membrana y ácidos grasos, como posibles factores desencadenantes de la formación de estructuras amiloides, de manera que se pueden plantear nuevas estrategias para modular el plegamiento de las estructuras amiloides. Por otro lado, la interacción entre la amilina y moléculas lipídicas pueden inducir estrés de RE, ya que la interacción entre ambos, podrían potencializar la disfunción exacerbada de las células β , promoviendo la apoptosis. De manera que el análisis de las vías de respuesta a proteínas desplegadas (IRE1, ATF6, PERK), es de gran interés para la regulación del estrés de RE y la homeostasis celular. Así mismo, analizar la posible interacción de los agregados amiloides sobre las rutas metabólicas implicadas con el metabolismo del colesterol y ácidos grasos, como las proteínas SREBP-2 y ABCA1. De manera particular SREBP-2, es un factor de transcripción asociado con la regulación de genes que promueven la síntesis de colesterol, en contraposición de la síntesis de ácidos grasos. Por otro lado, ABCA1 al ser un transportador encargado de regular la homeostasis de colesterol y fosfolípidos, es relevante su estudio en condiciones de lipotoxicidad. Por lo tanto, el conocer el comportamiento estructural de la amilina a estímulos lipídicos pueden ser de gran relevancia para comprender como estos cambios estructurales afectan la homeostasis de las células β , y así generar nuevas estrategias para reducir el daño celular y eventualmente escalar nuestro modelo de estudio a un modelo *in vivo*.

3 Planteamiento del Problema.

La amilina es un péptido con la capacidad de formar fibras de tipo amiloide, que en conjunto con un aumento en los AGL favorece condiciones de estrés de retículo endoplásmico, lo cual induce a la disfunción celular. La presencia de fibras amiloides es una característica en el desarrollo de la DM2, lo cual cobra una amplia relevancia debido a que la diabetes es la causa número uno de muertes en México, según la encuesta nacional de salud y nutrición 2016, donde se reporta que hay alrededor de 6.4 millones de adultos con diagnóstico de DM2 en nuestro país. De manera que el desarrollo de este trabajo permitirá ampliar el conocimiento sobre los factores que pueden desencadenar sus cambios conformacionales sobre los dominios específicos N- y C-terminal de la amilina, lo que a su vez podría ayudar a comprender cómo interaccionan a nivel celular. De manera que, el uso de nuevas variantes para inhibir la formación de fibras amiloides y mantener la homeostasis celular, podrían mejorar tanto la viabilidad como la función de las células- β , aumentando la secreción de insulina o regulando efectivamente la síntesis de ácidos grasos. Por lo tanto, la generación de conocimiento para entender el comportamiento de los dominios de amilina así como sus tendencias agregativas, es una condición que debe sentar las bases promover el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas. De manera que se busca conocer las como las interacciones lipídicas pueden modular la estructura secundaria de la amilina y como esto puede alterar su fisiología.

4 Hipótesis

Las interacciones lipídicas sobre la amilina favorecerán cambios en la estructura secundaria, la cual promoverá la formación de estructuras de tipo β originando conformaciones más complejas como los oligómeros que pueden alterar la fisiología de las células β .

5 Hipótesis Nula

La interacción entre amilina y lípidos no causará efectos en la conformación estructural de la amilina.

6 Objetivo General

Caracterizar cómo la interacción de un ambiente lipídico podría modular cambios conformacionales a nivel de estructura secundaria de tipo β en la amilina y en variantes diseñadas *de novo*, así como las posibles implicaciones en la homeostasis de las células- β .

7 Objetivos Específicos

Estudiar, a través de diversas técnicas bioquímicas y espectroscópicas, el mecanismo por el cual los lípidos podrían generar cambios conformacionales a nivel de estructura secundaria, y promover la agregación en segmentos de la amilina.

Emplear células- β de Langerhans como modelo para evaluar los mecanismos fisiopatológicos que induce la amilina en diferentes estados conformacionales, mediante la caracterización de la respuesta celular al estrés de RE, y proteínas que participan en la regulación del calcio y colesterol.

Caracterizar al menos una variante resultante del estudio *in-sillico*, utilizando el ambiente lipídico como modulador de estructuras secundarias, y evaluar el impacto sobre el modelo de células- β .

8 Variables.

<i>Variable independiente:</i>	Segmento	amino	terminal
(¹ KCNTATCATQRLANFLVHSS ²⁰)	y	carboxilo	terminal
(²³ FGAILSSTNVGSNTY ³⁷) de la IAPP humana.			

Variable dependiente: Concentraciones de lípidos en vesículas de fosfatidilcolina, micelas de ácido lisofosfatídico, vesículas de fosfatidilcolina y ácido palmítico, vesículas de fosfatidilcolina y ácido oleico.

9 Materiales y métodos.

En el presente trabajo se utilizaron diferentes técnicas que comprenden la preparación de lípidos y péptidos. Particularmente se estandarizaron técnicas espectrofotométricas las cuales permitieron caracterizar los cambios conformacionales sobre los segmentos de la amilina, como la densidad óptica a 218 nm, a través de la resonancia del enlace péptido que permite determinar si hay cambios a nivel de estructura secundaria. Del mismo modo, con la ayuda de moléculas como el rojo Congo los cuales son afines a estructuras fibrilares se pueden observar los cambios en la birrefringencia mediante la medición a 494 nm. Además con ayuda de la fluorometría y la tioflavina T (ThT), la cual es excitada a una longitud de onda de λ_{Ex} 450 nm para posteriormente observar la presencia de estructuras de tipo β al aumentar la emisión en un rango de λ_{Em} 460 a 610 nm. Para complementar el estudio se realizaron ensayos celulares, los cuales permiten conocer la viabilidad celular a través de un ensayo de MTT, así como la expresión de diferentes proteínas relacionadas con la vía UPR, y la síntesis y manejo de colesterol y ácidos grasos, por medio de la técnica de western blot.

9.1 Preparación de Lípidos.

9.1.1 *Ácido Lisofosfatídico (LPA).*

El ácido lisofosfatídico se obtuvo de Avanti Polar Lipids, a una concentración de 25 mg/mL, de la cual se preparó una solución de trabajo de 7.5 mM. Para un volumen de 1.2 mL se tomó la cantidad de 160 μ L de LPA stock para ser secada bajo un flujo de nitrógeno y en obscuridad por 1 h. Después se colocó en la vacofuga speedvac (eppendorf, Alemania) a 30°C por 5 h, y a continuación se agregó 1.2 mL de solución amortiguadora a pH 7.4. Posteriormente se resuspendió el pellet con ayuda del vortex, y se realizaron 4 ciclos de congelación, los cuales consistieron en sumergir el vial en nitrógeno líquido, y después se atemperó a 37°C. A continuación se dejó en incubación por 1 h a temperatura ambiente, y finalmente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, recuperando solamente el sobrenadante y manteniendo la preparación lipídica a 4°C hasta su uso.

9.1.2 Fosfatidilcolina (PC).

La fosfatidilcolina liofilizada fue obtenida por Avanti Polar Lipids, se disolvió en cloroformo a una concentración de 20 mg/mL, a partir de la cual se preparó la solución de trabajo con una concentración de 1.2 mg/mL, de la cual se tomaron las cantidades requeridas y posteriormente se secó bajo un flujo de nitrógeno por 1 h protegido de la luz. Una vez pasado el tiempo se colocó en la vacofuga speedvac (eppendorf, Alemania) por 5 h a 30°C. Después se procedió a colocar la cantidad correspondiente de buffer pH 7.4 y se resuspendió el pellet con ayuda de agitación, para posteriormente hacer ciclos de sonicación, los cuales consistieron de 15 s continuos de sonicación seguidos por 30 s de descanso en un lapso de 10 min, todo sobre una cama de hielo para evitar el sobrecalentamiento. Para la sonicación se utilizó un dispositivo cole-parmer ultrasonic homogenizer 36260. Posteriormente se realizaron 2 ciclos de 10 min con un máximo de 4 ciclos, hasta lograr una solución transparente y homogénea. Posteriormente se incubó por 1 h a temperatura ambiente para su estabilización, y finalmente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, recuperando solo el sobrenadante y manteniendo al lípido a 4°C hasta su uso.

9.1.3 Vesículas de fosfatidilcolina con ácido oleico.

La preparación de las micelas se realizó en una relación molar 2 a 1, siendo dos partes las que corresponden a PC y una a ácido oleico (OA). Las concentraciones stock para PC fueron de 20 mg/mL y para OA de 10 mg/mL, posteriormente se tomaron las cantidades requeridas para una concentración final de lípidos de 1.2 mg/mL, y se mezclaron con una agitación moderada en cloroformo. Posteriormente la solución se puso bajo un flujo de nitrógeno por 1 h 20 min protegido de la luz, pasado este tiempo se colocaron en la vacofuga speedvac (eppendorf, Alemania) por 5 h 30 min a 30°C. Después se agregó la cantidad requerida de buffer pH 7.4. Posteriormente se realizaron dos ciclos de sonicación, bajo el mismo protocolo utilizado en la metodología de la PC, hasta que la solución se tornó transparente. Finalmente se incubó por 1 h a temperatura ambiente para su estabilización, y se centrifugó a 13,000 rpm por

La concentración de trabajo de la solución peptídica fue de 0.6 mg/mL, a partir de la cual se realizaron pruebas en las diferentes soluciones antes mencionadas. El proceso de homogenización se llevó a cabo con ayuda de agitación por medio de vortex, así como de un spin de 10 s en una microcentrifuga, con el fin de observar si la disolución del péptido se llevó a cabo completamente. Se encontró que tanto, en agua ultrapura como en el amortiguador pH 4 se logró una mejor disolución para el segmento carboxilo, mientras que para el segmento amino la mejor disolución se obtuvo en agua ultrapura así como en el amortiguador pH 7.4. Considerando los resultados obtenidos, se optó por el agua ultrapura para disolver ambos péptidos, puesto que es necesario que ambos péptidos se encuentren en las mismas condiciones para realizar los experimentos. Cabe destacar que el tiempo que tardan en disolverse ambos péptidos es diferente, siendo más rápido la disolución del segmento amino con respecto al segmento carboxilo. Los péptidos se utilizaron de manera inmediata una vez preparados, o bien se congelaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

9.3 Mediciones espectrofotométricas.

9.3.1 Preparación de las muestras con rojo Congo.

Las muestras utilizadas fueron de un volumen de 300 µL con una concentración de 60 µg/mL de péptido amino o carboxilo según sea el caso, y a su vez una cantidad variable de lípido en relación al peso del péptido. En el caso de las muestras con rojo Congo, se prepararon muestras de 200 µL, las cuales constan de 80 µL de la muestra previamente mencionada, 40 µL de rojo Congo 20 mM, y 80 µL de buffer de fosfatos 20 mM y pH 7.4. Cabe destacar que los buffers y colorantes así como el agua utilizada para estos experimentos fue filtrada por membranas PES, con un poro de 0.22 µm, para mantener la calidad e igualdad en las muestras.

9.3.2 Caracterización del enlace peptídico.

Los valores de absorbancia obtenidos en mediciones a 218 nm indican cambios en el enlace peptídico de acuerdo con varios trabajos previos de nuestro grupo (12, 13), lo que permite evaluar la estructura secundaria de los

péptidos, siendo un parámetro indicativo de la presencia de cambios conformacionales a nivel de estructura secundaria. Las mediciones se realizaron utilizando un Smart spectrophotometer de BioRad, utilizando una cubeta de cuarzo, con un volumen de muestra de 200 μ 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.

9.3.3 *Mediciones con rojo Congo a 494 nm*

Las mediciones utilizando el ensayo 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 β , debido al cambio de birrefringencia. Se utilizó un Smart spectrophotometer de BioRad, con una cubeta de cuarzo, el volumen de muestra fue de 200 μ L, todas las muestras se llevaron a cabo 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.

9.3.4 *Caracterización por fluorescencia.*

Para el ensayo de fluorimetría las muestras fueron acopladas al ensayo con Tioflavina T (ThT) para caracterizar estructuras de tipo β . Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un fluorómetro Cary Eclipse, utilizando una longitud de onda (λ) de excitación a 450 nm, y un rango de emisión de 460 a 610 nm. Las muestras se prepararon igual que las muestras para mediciones espectrofotométricas pero con una reducción en el volumen, quedando un volumen final de 220 μ L. Las muestras se incubaron por 12 h a 37°C, antes de realizar la medición se agregó 1 μ L de ThT 1 mM por cada 50 μ L de muestra, y se homogeneizó con ayuda de agitación, posteriormente se realizó 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.

9.4 Ensayos celulares.

Para los ensayos celulares se realizó la misma preparación de muestras utilizada para las mediciones espectrofotométricas, quedando con una cantidad de 60 µg/mL de péptido N-ter o C-ter según el caso. Además se agregó la cantidad creciente de lípido correspondiente en una relación masa/masa con respecto al péptido, las muestras fueron incubadas por 12 h, antes de ser incorporadas a los cultivos celulares.

Se utilizó la línea celular RIN-m5F proveniente de insulinoma de rata por ATCC (American Type Culture Collection), puesto que son un modelo de células-β las cuales secretan insulina. Estas células fueron cultivadas a 37°C, en 5% CO₂ y en medio RPMI. Para los ensayos de reducción de MTT se utilizaron cajas de 96 pozos y para la realizar los western blot se usaron cajas de 6 pozos, en ambos casos se sembraron 260,000 células/mL. Las células se dejaron proliferar por al menos 72 h previas al experimento, donde se alcanzó una confluencia del 90%; una vez alcanzada esta confluencia, se colocaron 200 µL de la muestra con péptido en 800 µL de medio de cultivo, para los ensayos utilizados en la prueba de western blot. Por otro lado, se utilizó una relación de 720 µL de medio con 180 µL de muestra, para las pruebas utilizadoa en los ensayos de reducción de MTT; el estímulo se mantuvo de 12-16 h para su posterior procesamiento en ambos casos.

9.4.1 *Ensayo de reducción de MTT.*

Para evaluar la citotoxicidad en las células-β se utilizó el ensayo de reducción de MTT, los cuales se realizaron en cajas de 96 pozos. Cuando se alcanzó la densidad celular requerida, se pusieron en ayuno utilizando el medio Opti-MEM, el cual no contiene suero fetal bovino ni rojo de fenol. Después de una hora en incubación se retiraron y se les agregó el estímulo con una parte de medio Opti-MEM, el cual se incubó de 12-18 h, posteriormente se agregó amortiguador de lisis, y se dejó por 18 h, para después realizar la medición en un lector de placas de ELISA.

9.4.2 Caracterización de proteínas por Western blot.

Una vez que las células completaron su etapa con los estímulos, se llevó a cabo el procesamiento para la obtención del lisado celular. El cultivo se lavó 2 veces con PBS a 4°C, posteriormente se agregaron 170 µL de buffer de lisis de proteínas, sobre una cama de hielo. A continuación se incubaron con agitación a 4°C por 35 min. Una vez concluida la incubación, la solución se transfirió a una jeringa de insulina con una aguja de 27G, en la cual se homogenizó 6 veces, después de este paso la solución se centrifugó a 8000 rpm por 10 min a 4°C y finalmente se recuperó el sobrenadante, para posteriormente realizar la cuantificación proteica, por el método del ácido bicinconínico.

Para realizar la identificación por Western blot se realizó una electroforesis en la que se utilizaron 20 µg de proteína total, que fueron separadas por medio de SDS-PAGE al 10% y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios: anti-PMCA ATPase, anti-CHOP, anti-rLDL, anti-SREBP2, anti-ABCA1, anti-apoA1. La incubación se realizó toda la noche a 4°C, posteriormente se lavaron con una solución TBST/ 0.1% tween, después se incubaron durante 1 h a 37°C con los anticuerpos secundarios respectivos (IgG anti-ratón, IgG anti-conejo, IgG anti-cabra acopladas a peroxidasa de rábano), adicionalmente se realizaron varios pasos de lavado. El proceso de revelado se llevó a cabo mediante la detección de quimioluminiscencia.

9.5 Análisis in silico.

9.5.1 Análisis de secuencias.

A través de la búsqueda en la base de datos de proteínas del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el término polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) (41) se encontraron 314 secuencias, que corresponden a 284 eucariotas, y otras 30 a secuencias asociadas. Para nuestro análisis, consideramos sólo 240 de las 284 que integran las secuencias caracterizadas, predichas y parciales.

9.5.2 *Parámetros fisicoquímicos.*

El análisis fisicoquímico de las secuencias de péptidos incluyó el momento hidrofóbico (μH), la carga neta electrostática, la hidrofobicidad media, el punto isoeléctrico (pI), la velocidad media teórica de agregación y patrones incluyendo residuos que promueven interacciones de membrana como el auto-ensamblaje y la agregación (13, 42). Adicionalmente, la evaluación de secciones específicas de la IAPP se llevó a cabo en el dominio N-terminal ¹KCNTATCATQRLANFLV¹⁷ y el C-terminal ²³FGAILSSTNVGSNTY³⁷.

9.5.3 *Caracterización de la propensión a la agregación.*

Se emplearon varios algoritmos para predecir la propensión a la agregación de las estructuras secundarias tipo beta. Las secuencias de amilina se caracterizaron a través de múltiples alineamientos mediante el uso de plataformas especializadas como Aggrescan, PASTA 2.0 y Zyaggregator.

En el caso de Aggrescan, utiliza un parámetro el cual es calculado basado en los valores de propensión a la agregación de cada aminoácido a partir de datos experimentales, entonces se calcula el valor promedio de cada residuo a partir de un parámetro denominado “sliding window” el cual asigna el valor al residuo central. Aggrescan tiene un base de datos de 57 proteínas amiloidogénica, en las cuales se conoce la localización de los “hot spots” de manera experimental (43, 44).

Ahora bien, 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 y 6472 residuos regulares, provenientes de la literatura (43).

Por último, el Ziggagregator es un método para predecir las propensiones a la agregación de proteínas amiloides, que toman diferentes factores intrínsecos como referencia, como hidrofobicidad, carga, pH, fuerza iónica, concentración. Todos estos parámetros están incluidos en un algoritmo que calcula 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- β y α -hélices (45, 46).

9.5.4 *Secuencias diseñadas de novo.*

Con base en las diferencias entre las secuencias de IAPP, se evaluaron, una, dos y tres sustituciones de residuos correspondientes a las diferencias entre las 239 secuencias IAPP y la IAPP humana (hIAPP), adicional a la caracterización de los parámetros fisicoquímicos y de agregación. Para definir los índices de propensión a la agregación se consideró el valor de agregación basado en Aggrescan para la generación de nuevas variantes, tomando como referencia a la hIAPP.

10 Resultados.

10.1 *Análisis in silico.*

A través de la búsqueda en la base de datos del NCBI, se generó una compilación de secuencias de amilina correspondientes a 240 especies diferentes, dentro de las cuales se encontraron de la Clase Mammalia con 97 especies y 103 de la Clase Aves, las cuales se muestran en la Tabla 1 (Anexos). Así mismo, se obtuvieron los siguientes parámetros fisicoquímicos: hidropatía, punto isoeléctrico, momento hidrofóbico, hidrofobicidad promedio; además se evaluó la tendencia a la agregación de cada una de las secuencias, utilizando programas específicos para predecir dichos cambios estructurales. Los algoritmos utilizados fueron: Aggrescan, ziggagregator y PASTA 2.0, siendo el programa Aggrescan el más adecuado para el estudio. De tal manera

que se elaboró una tabla en donde se compararon las secuencias de las diferentes especies, en la cual se muestran los valores obtenidos en Aggrescan, PASTA, hidropatía, pI, pH e hidrofobicidad (Tabla 2).

Por otra parte, al comparar las secuencias de las distintas especies, se realizó un procedimiento de alineación múltiple de las secuencias, donde se lograron observar los sitios más conservados, así como las zonas de mayor variabilidad en las secuencias de amilina (Fig. 3A). Además se obtuvo la tendencia a la agregación de cada una de las secuencias, encontrándose que la amilina humana se localiza en un punto intermedio de todas las secuencias estudiadas (Fig. 3B), teniendo un valor de Aggrescan de -5.6.

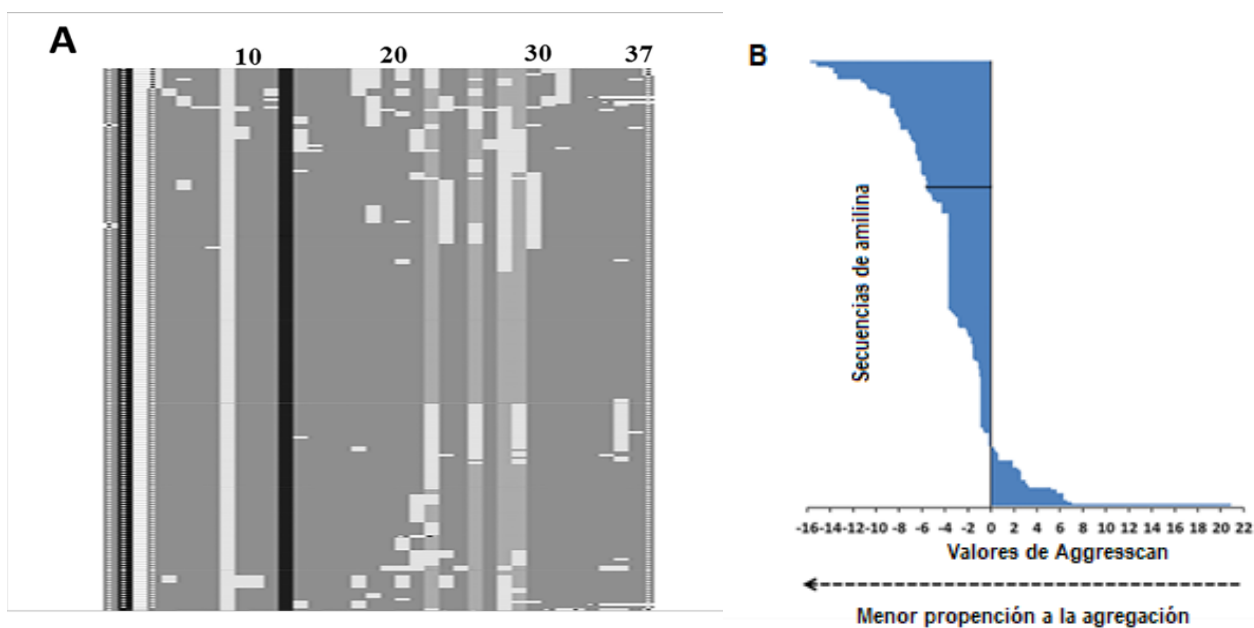


Fig. 3 Análisis comparativo entre las 240 secuencias de IAPP. A) Alineamiento múltiple de secuencias de las 240 secuencias analizadas, el color más oscuro indica mayor conservación entre los residuos. B) Comparación entre el índice de agregación de las 240 secuencias obtenidas con el programa Aggrescan, en color negro se encuentra la amilina humana.

Al realizar el comparativo entre las secuencias de diferentes especies y al analizar su propensión a la agregación, se encontraron algunas secuencias que tenían valores con mayor propensión a la agregación (valores positivos), así como con menor propensión a la agregación (valores negativos), siendo los más relevantes los que se muestran en la Tabla 2, en donde están marcados de color rojo los sitios con mayor tendencia a la agregación, denominados “*hot spots*”, los cuales son secciones de 5 o más residuos principalmente hidrofóbicos, dentro de los aminoácidos más importantes se encuentran la leucina, isoleucina, valina y fenilalanina, los cuales promueven las interacciones hidrofóbicas y por ende los fenómenos de agregación proteica (47).

Una vez identificado estos sitios (“*hot spots*”), y al realizar el comparativo de secuencias, se tomó como base la secuencia de hIAPP, donde se sustituyó aminoácido por aminoácido, con cada uno de los diferentes residuos de las secuencias, dando como resultado nuevas variantes. De tal manera que las nuevas variantes mostraron propiedades diferentes con un sólo cambio de residuo sobre la hIAPP. En la Tabla 3 se muestran las nuevas variantes generadas, así como los valores de Aggrescan, hidropatía, y el organismo del que se originan las variantes, mostrándose al menos 15 secuencias con menor propensión a la agregación en comparación a la hIAPP. Además, se realizaron dobles sustituciones, con el fin de optimizar la secuencia de amilina humana, obteniendo 95 nuevas secuencias con un menor índice de agregación; así también se realizó una triple sustitución, debido a que el análogo comercial de la hIAPP, la pramlintida, presenta 3 cambios de residuos. En nuestro estudio se obtuvieron 644 nuevas variantes con 3 sustituciones con un menor índice de agregación que la pramlintida.

Dentro de los cambios de residuos más relevantes se encuentran la sustituciones V₁₇D y F₂₃R, ya que estas eliminan los “*hot spots*”, además mostraron valores más negativos en el algoritmo de Aggrescan, sin embargo la variante F₂₃R, fue la que causó más interés, debido a que se encuentra en la

región C-terminal, la cual se ha descrito como núcleo amilodogénico de la amilina, en este sentido la variante F₂₃R se eligió para ser evaluada de manera experimental.

Sin embargo, la secuencia no es lo único que podría determinar la tendencia a la agregación de la amilina, si no el microambiente circundante. De tal manera que es de gran relevancia el estudiar el ambiente lipídico y su interacción con la amilina, puesto que una de las interacciones más importantes que tiene ésta es en un ambiente lipídico en la membrana celular, la cual podría actuar como una condición moduladora de los fenómenos de agregación.

Tabla 2. Secuencias de amilina de las especies con mayor y menor propensión a la agregación. Valores de Aggrescan, PASTA, hidropatía, pl, μ H e hidrofobicidad promedio, comparado con la secuencias de amilina humana. Las regiones de mayor agregación (*hot spots*) se identifican en color rojo.

Organism	Sequence	Aggrescan	PASTA	Hydropatia	pl	μ H	Hidrofobicidad
<i>Pteropus Alecto</i>	KCD TAIYAIQW LANFLVHSSNN FSVILSLTN VGSNTY	20.9	-12.882	0.36	7.2	0.16	0.25
<i>Oryzias latipes</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYV PTNVGSATY	7	-6.288	0.1	9.0	0.21	0.07
<i>Cyprinodon variegatus</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGAVYV PTNVGSSTY	6.6	-5.707	0.1	9.0	0.20	0.07
<i>Fundulus heteroclitus isoform x1</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYV PTNVGSSTY	6.3	-6.288	0.03	9.0	0.22	0.05
<i>Xiphophorus maculatus</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYV PTNVGSSTY	6.3	-6.288	0.03	9.0	0.22	0.05
<i>Austrofundulus limnaeus</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYV PTNVGSSTY	6.3	-6.288	0.03	9.0	0.22	0.05
<i>Ochotona princeps</i>	KC NTIT CATQRLANFLVHSSNNF GAI FSPVNLGSKSY	5.2	-4.341	0.04	9.7	0.26	0.10
<i>Jaculus jaculus</i>	KCNTATCATQRLANFL VRSS SSLGVIL PATNVGSNTY	3.3	-4.155	0.15	9.8	0.19	0.08
<i>Danio</i>	KCNTATCVTQRL ADFLIR SSNT IGTVYA PTNVGSATY	3.2	-4.252	0.04	9.0	0.22	0.07
<i>Pterocles</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNN IGAIYS PTNV GSYTY	3	-3.568	-0.12	8.9	0.23	0.03
<i>Maylandia zebra</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYA PTNVGSATY	2.6	-4.284	0.03	9.0	0.22	0.06
<i>Haplochromis burtoni</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYA PTNVGSATY	2.6	-4.284	0.03	9.0	0.22	0.06
<i>Pundamilia nyererei</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYA PTNVGSATY	2.6	-4.284	0.03	9.0	0.22	0.06
<i>Oreochromis niloticus</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYA PTNVGSATY	2.6	-4.284	0.03	9.0	0.22	0.06
<i>Larimichthys crocea</i>	KCNTATCVTQRL ADFLVR SSNT IGTVYA PTNVGSATY	2.6	-4.284	0.03	9.0	0.22	0.06
<i>Homo sapiens</i>	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSS STNVGSNTY	-5.6	-4.939	-0.1	9.1	0.20	0.06
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	KCNTATCATQRL TNFLVR SSNNLG PVLP PTNVGSNTY	-9.1	-4.465	-0.32	9.8	0.24	-0.02
<i>Bos taurus</i>	KCGTATCETQRLANFL LAP SSNKL GAI FSP TKM GSNTY	-9.7	-1.880	-0.28	9.6	0.15	0.02
<i>Erinaceus europaeus</i>	RC NTATCATQRL VNFLSR SSNNLG AIL SP TDV GSNTY	-9.9	-4.384	-0.21	9.1	0.24	-0.04
<i>Capra hircus</i>	KCGTATCATQRLANFL LAP SGNKL GAVF SS TKM GSNTH	-10.7	-1.880	-0.17	10.3	0.17	0.04
<i>Cricetulus</i>	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNLG PVLS PTNVGSNTY	-10.8	-3.884	-0.27	9.1	0.20	0.03
<i>Macaca fascicularis</i>	KCNTATCATQRLANFL VR SSNNF GTIL SSSTNVGSNTY	-10.8	-4.354	-0.2	9.8	0.27	-0.01
<i>Octodon</i>	KCNTATCATQRL TNFLVR SSNNLG AALP PTKVGSNTY	-11	-4.465	-0.29	10.2	0.21	-0.03
<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	KCNTATCS MHRL ADFLGRSGNNF GAIL SPPTNVGSNTY	-11.3	-1.880	-0.26	9.1	0.27	0.02
<i>Balearica regulorum gibbericeps</i>	KCNTATCS MHRL ADFLGRSGNNF GAIL SPPTNVGSNTY	-11.3	-1.845	-0.26	9.1	0.27	0.02
<i>Sus scrofa</i>	KCNMATCATQHLANFLDRSRNNL GTIF SP TKV GSNTY	-13.4	-2.364	-0.44	9.7	0.25	-0.07
<i>Ovis aries musimon</i>	KCGTATCATQRLANFL LAP SGNKL GAVF SP PRK MGSNTH	-13.7	-1.880	-0.29	10.8	0.12	-0.02
<i>Odobenus rosmarus</i>	KCNTATRATQRLANFL VR SSNNLG AIL SHPTNVGSNTY	-14.1	-4.224	-0.36	11.3	0.33	-0.08
<i>Bos mutus</i>	KCGTATCETQRLANFL LAP SSNKL GAI SS PTK MGSNTY	-15.2	-1.880	-0.38	9.6	0.12	-0.02
<i>Bison bison bison</i>	KCGTATCETQRLANFL LAP SSNKL GAI SS PTK MGSNTY	-15.2	-1.880	-0.38	9.6	0.12	-0.02
<i>Sorex araneus</i>	KCNTATCATQRL TNFLTR SSNN IGAI PPSTNVGSNTY	-15.7	-2.542	-0.45	9.8	0.23	-0.06

Tabla 3. Efecto de la sustitución de una sola variante sobre la amilina humana. Se ordenaron las 15 secuencias con menor agregación seguido de 15 secuencias con mayor agregación en comparación con la amilina humana, en color rojo se marcaron los *hot spots*, también se muestra a los organismo en los cuales se presenta de manera natural la variante realizada.

Variante	Secuencia	Na4VSS	Hidropatía	PASTA	Organismos
V ₁₇ D	KCNTATCATQRLANFLD HSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-14.8	-0.31	-3.46	<i>S. crofa</i>
F ₂₃ R	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNRGAILSSTNVGSNTY	-13.6	-0.30	-3.88	<i>C. auratus</i>
L ₂₇ H	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAHSSTNVGSNTY	-12.1	-0.29	-4.10	<i>L. chalumnae</i> ,
F ₂₃ G	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNGGAILSSTNVGSNTY	-11.7	-0.18	-3.88	<i>P. cristatus</i>
V ₃₂ G	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNGGSNTY	-11.3	-0.22	-4.21	<i>P. cristatus</i>
V ₁₇ G	KCNTATCATQRLANFLG HSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-11.3	-0.22	-3.46	<i>A. nancymae</i> , <i>B. regulorum</i> , <i>S. boliviensis</i>
I ₂₆ A	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAALSSTNVGSNTY	-10.6	-0.17	-3.88	<i>C. cristata</i> , <i>C. porcellus</i> , <i>F. damarensis</i>
A ₂₅ D	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGDILSSTNVGSNTY	-10.4	-0.24	-3.95	<i>C. cristata</i>
F ₂₃ A	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNA GAILSSTNVGSNTY	-10.4	-0.12	-3.88	<i>G. fortis</i> , <i>Z. albicollis</i> ,
V ₁₇ T	KCNTATCATQRLANFLT HSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-10.3	-0.23	-3.46	<i>C. harengus</i> , <i>E. lucius</i> , <i>S. araneus</i>
L ₂₇ S	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAIVSSTNVGSNTY	-10.1	-0.22	-6.19	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>C. cristata</i> , <i>P. cristatus</i>
V ₁₇ A	KCNTATCATQRLANFLA HSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-10.0	-0.16	-3.46	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>B. taurus</i> , <i>B. bubalis</i>
A ₈ E	KCNTATCETQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-9.3	-0.24	-4.94	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>B. taurus</i>
Y ₃₇ H	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTH	-9.1	-0.15	-4.94	<i>C. hircus</i> , <i>O. aries</i>
T ₃₆ S	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNSY	-9.1	-0.10	-4.94	<i>O. princeps</i> , <i>O. cuniculus</i>
<i>H. sapiens</i>	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-5.6	-0.10	-4.94	
K ₁ I	ICNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-1.1	0.13	-4.94	<i>P. hamadryas</i> ,
S ₂₉ L	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-1.0	0.03	-6.36	<i>P. alecto lq</i>
S ₂₈ L	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILLSTNVGSNTY	-1.0	0.03	-6.36	<i>C. porcellus</i> , <i>F. damarensis</i> , <i>H. glaber</i>
T ₃₀ V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSVNVGSNTY	-0.8	0.04	-6.86	<i>O. princeps</i>
S ₂₈ V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILVSTNVGSNTY	-0.5	0.04	-7.61	<i>A. limnaeus</i> , <i>C. variegatus</i> , <i>F. heteroclitus</i>
A ₂₅ I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGIILSSTNVGSNTY	-0.5	-0.02	-7.41	<i>P. cristatus</i>
A ₅ I	KCNTITCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-0.5	-0.02	-4.94	<i>O. princeps</i>
T ₉ I	KCNTATCAIQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-0.2	0.04	-4.94	<i>C. cristata</i> , <i>F. damarensis</i> , <i>H. glaber</i>
T ₆ I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	-0.2	0.04	-4.94	<i>A. nancymae</i>
S ₁₉ F	KCNTATCATQRLANFLVHFSNNFGAILSSTNVGSNTY	0.0	0.00	-6.50	<i>C. cristata</i>
R ₁₁ W	KCNTATCATQWLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	0.6	0.00	-5.84	<i>P. alecto lq</i>
T ₄ I	KCNITATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	0.9	0.04	-4.94	<i>A. nancymae</i>
N ₃₅ Y	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSYTY	1.1	-0.04	-4.94	<i>L. chalumnae</i> , <i>P. gutturalis</i>
N ₃₁ V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTVVGSTY	2.3	0.11	-6.97	<i>P. cristatus</i>
N ₂₂ I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNIFGAILSSTNVGSNTY	2.9	0.12	-3.46	<i>P. cristatus</i>

10.2 Modulación de la amilina mediada por el ácido lisofosfatídico.

El LPA es un lípido de 18 C en la cadena acilo y una insaturación, el cual se ha descrito que puede promover la formación de fibras de tipo amiloide en la β_2 -microglobulina, así como en otros péptidos (17). De manera que se realizaron experimentos para caracterizar su capacidad de modular y generar cambios conformacionales sobre la estructura de los diferentes segmentos de la amilina. Por lo que se evaluó el segmento amino ($^1\text{KCNTATCATQRLANFLVHSS}^{20}$) y el segmento carboxilo ($^{23}\text{FGAILSSTNVGSNTY}^{37}$). Para ello, se realizó un ensayo en donde se incubaron de manera independiente el segmento amino y el segmento carboxilo con concentraciones crecientes de LPA, las cuales fueron de 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.35, 0.5, 1, 2.5 y 5 mM. Posteriormente se realizó un análisis espectrofotométrico y de fluorescencia.

Dentro de los resultados obtenidos en los ensayos de espectrofotometría, se observó un aumento en la absorbancia a 218 nm, cuando el segmento C-terminal interacciona con las siguientes concentraciones de LPA: 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.35 mM, lo cual indica un cambio conformacional sobre el enlace peptídico, basado en estudios previos de nuestro grupo (12, 13). Sin embargo, el aumento fue menor en las concentraciones de 0.5, 1, 2.5, y 5 mM. Ahora bien, al usar la molécula rojo Congo y medir el cambio de birrefringencia a 494 nm, se observó que de la concentración 0.00625 mM hasta la concentración 0.1 mM, hubo un aumento en los valores de absorbancia debido al cambio de birrefringencia, dependiente de la concentración de LPA (Fig. 4). Por otra parte, el segmento amino, no mostró ningún efecto, considerando que las absorbancias obtenidas a 218 nm y 494 nm no generaron un resultado significativo. De manera que el segmento carboxilo es el más propenso a ser modulado por la interacción con LPA.

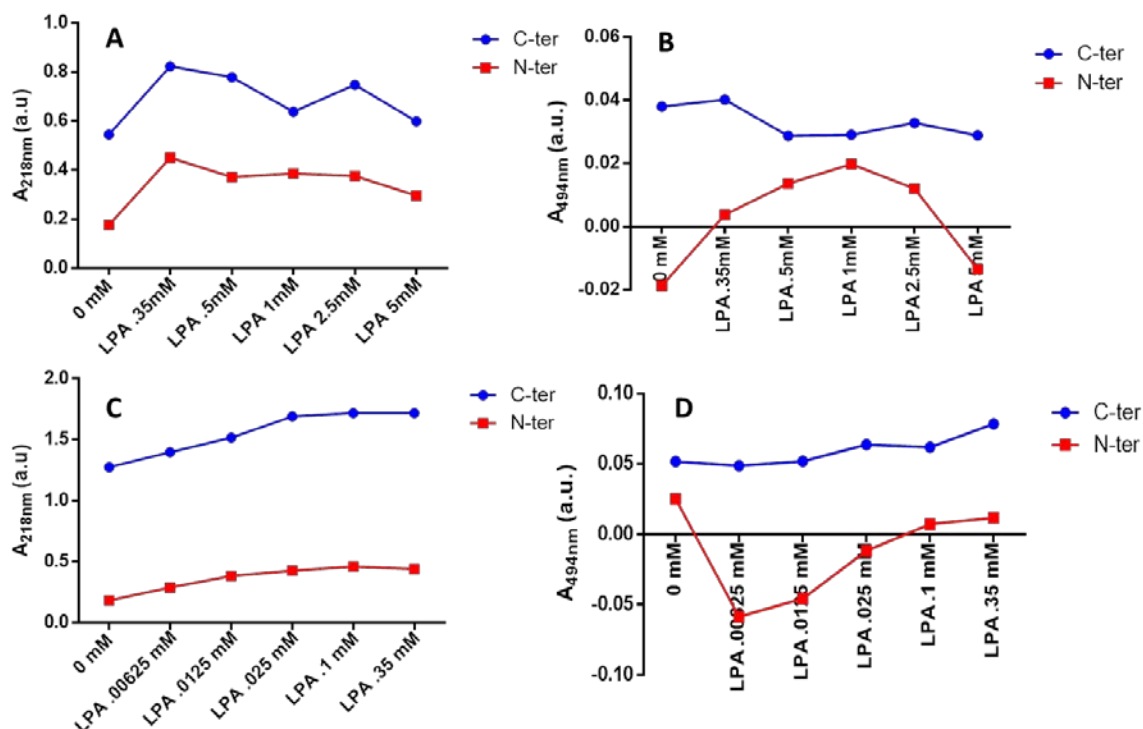


Fig. 4 Mediciones del enlace peptídico y birrefringencia con rojo Congo en los segmentos N- y C-terminal de la hIAPP. A) Medición del enlace peptídico del C-ter y N-ter interactuando con LPA en concentraciones altas. B) Cambio de birrefringencia con rojo Congo de los segmentos carboxilo y amino bajo la incubación con LPA en concentraciones altas. C) Medición del enlace peptídico del C-ter y N-ter bajo la incubación con LPA en concentraciones bajas. D) Cambio de birrefringencia con rojo Congo de los segmentos carboxilo y amino bajo la incubación con LPA en concentraciones bajas.

Ahora bien, en el ensayo de fluorescencia, el cual tiene una mayor sensibilidad para la detección de estructuras de tipo β en comparación con el ensayo de rojo Congo, se observó un comportamiento gaussiano (Fig.5), el cual se pudo originar por las diferentes concentraciones de LPA al interactuar con el segmento carboxilo solamente. Cabe destacar que este comportamiento se ha observado en estados intermedios durante el proceso de desplegamiento de proteínas. Se encontró el punto máximo de fluorescencia entre las concentraciones de 0.05 y 0.1 mM, lo cual podría estar asociado con la concentración micelar crítica (CMC) del LPA (0.09 mM), de manera que al aumentar la concentración más allá de 0.1 mM, la señal empieza a decaer, debido a una sobresaturación de LPA y la formación de micelas.

Además, en modelos con el beta amiloide se ha observado que niveles justo por debajo del CMC promueven una agregación más rápida, debido a que presenta una mayor solubilidad (48), esto implica que la CMC es un factor relevante al llevarse a cabo interacciones en soluciones acuosas, como las que se realizaron experimentalmente. Por lo anterior, un aumento en la concentración origina la inhibición en la formación de estructuras de tipo β , indicando una posible modulación mediada por LPA (Fig. 5). Por otra parte, los resultados indican que el segmento amino no mostró interacción significativa, puesto que no se logró observar algún cambio al momento de ser expuesto a las diferentes concentraciones de LPA, sugiriendo que los dos segmentos tienen comportamientos diferentes, lo cuales son dependientes de su secuencia. En la Tabla 4 se muestran las características fisicoquímicas de los segmentos de IAPP, siendo el segmento carboxilo más hidrofóbico y con un menor pI que el segmento amino, lo que nos indica una mayor afinidad hacia los lípidos, lo cual explica los cambios estructurales en la formación de fibras de tipo amiloide.

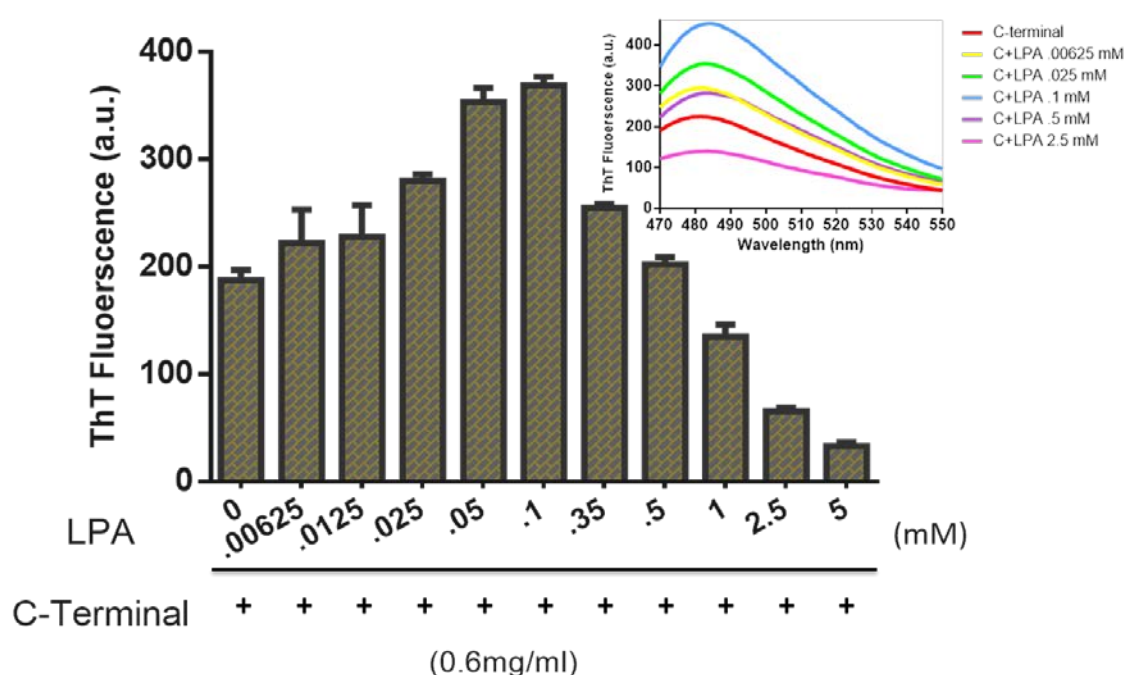


Fig. 5 Modulación del segmento Carboxilo mediado por concentraciones crecientes de LPA. Caracterización de la presencia de estructuras de tipo β por medio de fluorescencia acoplada a la sonda tioflavina T (ThT). Se logra apreciar a la concentración de 0.1 mM la mayor emisión de fluorescencia. En el inserto muestra los espectros de emisión de fluorescencia con las concentraciones más representativas.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de los segmentos carboxilo y amino, comparado con la secuencia completa de amilina humana.

	Secuencia de aminoácidos	Hidropatía	pI	pH	Hidrofobicidad
Amilina Humana	KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY	-0.097	9.049	0.198	0.061
Segmento Amino	KCNTATCATQRLANFLVHSS	-0.040	9.147	0.276	-0.026
Segmento Carboxilo	FGAILSSTNVGSNTY	0.280	5.928	0.185	0.290

10.3 Interacción de la fosfatidilcolina con los segmentos de la amilina.

Una parte del modelo experimental está centrado en la fosfatidilcolina (PC), el fosfolípido más abundante en las membranas celulares y de los orgánulos, por lo tanto podría ser el que presente una mayor interacción con la amilina de forma nativa. Para la preparación de PC se utilizó un modelo de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) en diferentes concentraciones: 60, 120, 240, 360, 480, 720, 960 µg/mL, con una cantidad utilizada de péptido de 120 µg/mL.

En el análisis espectrofotométrico a 218 nm, el segmento carboxilo mostró un aumento significativo al ser expuesto a diferentes concentraciones de PC, lo cual se muestra en el panel A de la Figura 6, lográndose observar un comportamiento de tipo sigmoidal, similar al que se representa en los estados intermediarios durante los proceso de desplegamiento de proteínas. Por otra parte, el segmento amino no muestra cambios significativos en lo que respecta a la caracterización del enlace peptídico (Fig. 6B). A su vez, en el ensayo con rojo Congo en el cual se utilizaron las mismas concentraciones de PC, se logra apreciar un fenómeno similar, siendo el segmento carboxilo el que presentó un aumento significativo, asociado con la formación de estructuras de tipo β (Fig. 6C). Sin embargo, el segmento amino no mostró ningún cambio significativo (Fig. 6D).

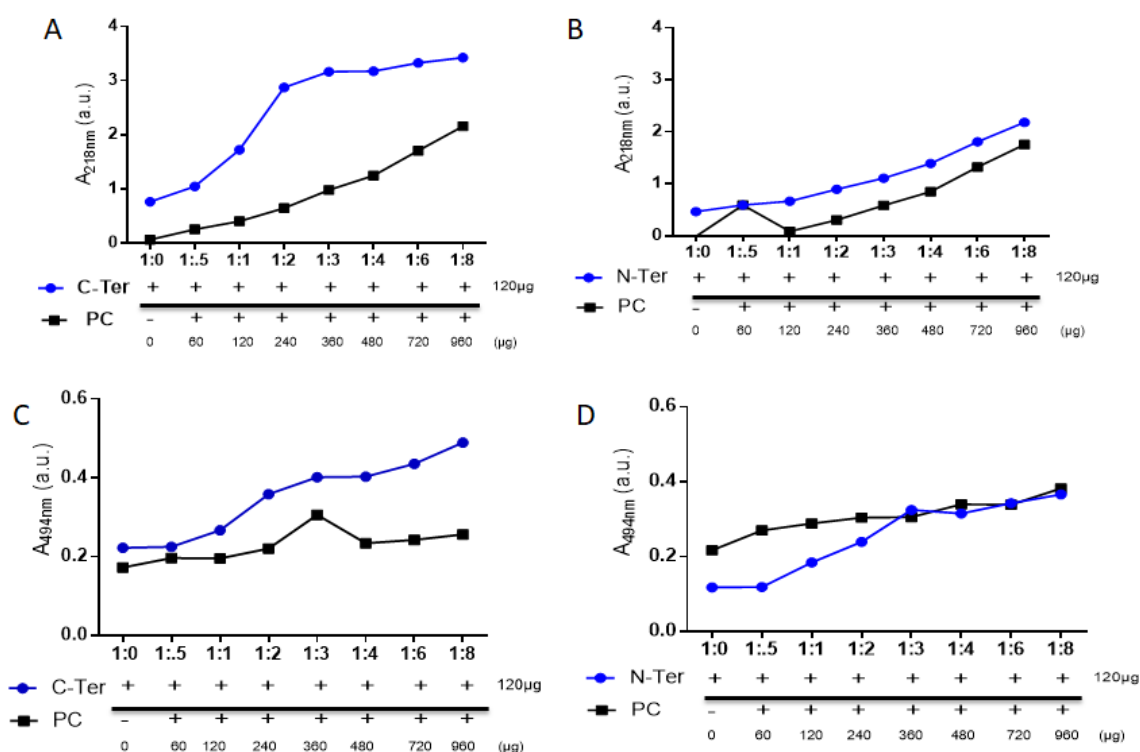


Fig. 6 Mediciones del enlace peptídico y rojo Congo en los segmentos de la IAPP. A) Medición del enlace peptídico del segmento carboxilo bajo la interacción con la fosfatidilcolina a diferentes concentraciones. B) Medición del enlace peptídico del segmento amino interactuando con la fosfatidilcolina a diferentes concentraciones. C) Cambio de birrefringencia con rojo Congo del segmento carboxilo interactuando con la fosfatidilcolina a diferentes concentraciones. D) Cambio de birrefringencia con rojo Congo del segmento amino interactuando con la fosfatidilcolina a diferentes concentraciones (Programa estadístico Prism).

Por otra parte, con el fin de ampliar la caracterización del cambio conformacional sobre el segmento carboxilo al interactuar con la PC, se realizó una cinética a 218 nm por 30 min (Fig 7 A), la cual pone de manifiesto que dicha interacción es un suceso rápido, que ocurre a los pocos minutos de estar en contacto el péptido con el lípido, para después estabilizarse. Sin embargo al realizar la cinética del N-terminal con la fosfatidilcolina (Fig. 7 B), no mostró una interacción que promueva la agregación del N-terminal, considerando que la suma de los valores de absorbancia del péptido y del lípido ascienden al valor obtenido de cuando ambos están en la misma muestra, sugiriendo que no existe una interacción que genere un cambio en el enlace peptídico del N-terminal.

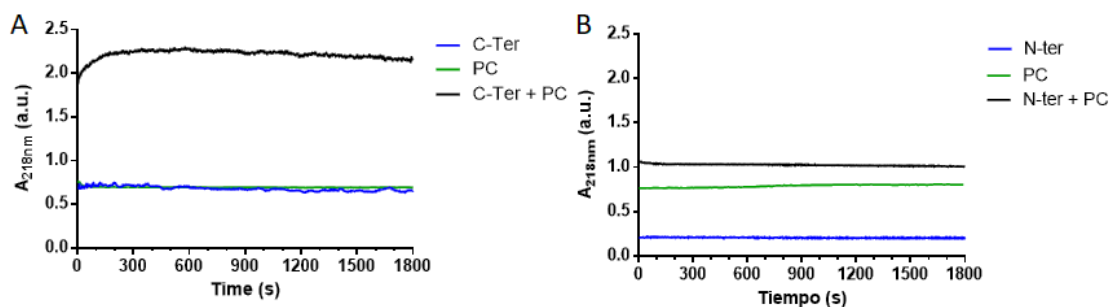


Fig. 7 Cinética del enlace peptídico. A) Medición del segmento carboxilo con una concentración de 120 $\mu\text{g/ml}$ mediado por fosfatidilcolina una concentración de 480 $\mu\text{g/ml}$. B) Medición del segmento amino con una concentración de 120 $\mu\text{g/ml}$ mediado por fosfatidilcolina a una concentración de 480 $\mu\text{g/ml}$.

10.4 Interacciones de la amilina con vesículas de ácido palmítico y oleico.

Ahora bien, se utilizaron vesículas compuestas por PC y un ácido graso libre (AGL), en primera instancia se evaluó al ácido palmítico (PA) de 16 carbonos saturado, y al ácido oleico (OA) de 18 C insaturado. Se eligieron para el estudio estos dos AGL por su mayor proporción a nivel fisiológico. Estos lípidos ya han sido utilizados en diversos estudios a nivel celular, en los que se muestran un posible efecto citotóxico del ácido palmítico (49, 50), mientras que el ácido oleico podría proteger a las células (49, 50). De manera que las relaciones utilizadas para las microvesículas fueron una relación masa/masa 2:1, es decir 2 partes de fosfatidilcolina, y 1 parte de AGL a evaluar. Esto es considerando las condiciones técnicas durante la preparación de las muestras.

De tal manera que al evaluar el enlace peptídico del segmento C-terminal, encontramos que la combinación fosfatidilcolina (PC) en conjunto con el ácido palmítico (PA) resulta en una aumento gradual en los valores obtenidos de absorbancia, al aumentar la concentración. Sin embargo, al compararlo con las vesículas de ácido oleico (OA), los valores obtenidos son menores y no muestran cambios al aumentar su concentración (Fig.8). Por otra parte el segmento amino no muestra ningún cambio aparente al interaccionar con las dos preparaciones de vesículas evaluadas.

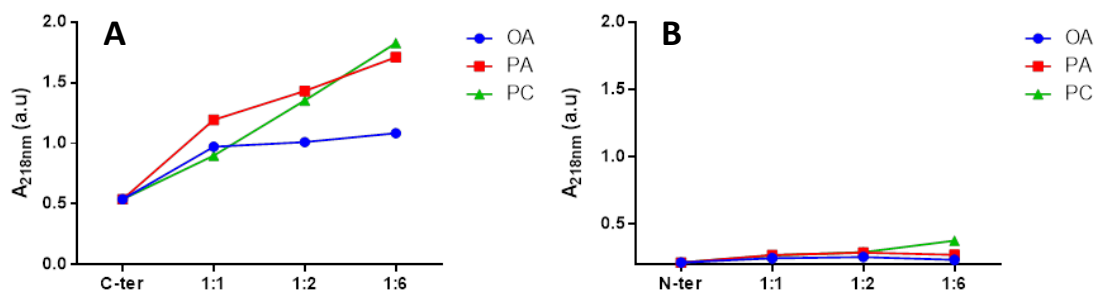


Fig. 8 Caracterización del enlace peptídico en preparaciones de vesículas con ácidos grasos. A) Segmento C-terminal interactuando con las vesículas de PC, PC+OA, PC+PA en concentraciones crecientes. B) Segmento N-terminal interactuando con las vesículas de PC, PC+OA, PC+PA en concentraciones crecientes.

Para definir la formación de estructuras de tipo β , precursoras de las fibras amiloides, se realizaron mediciones espectrofotométricas con el ensayo de rojo Congo. En este experimento se obtuvieron resultados comparables en tendencia a los obtenidos con las mediciones a 218 nm, en donde los cambios más importantes fueron con la PC, mientras tanto cuando interacciona con el ácido palmítico el aumento no fue tan significativo, por otra parte la interacción con el ácido oleico no mostró cambios relevantes en los valores de absorbancia (Fig. 9).

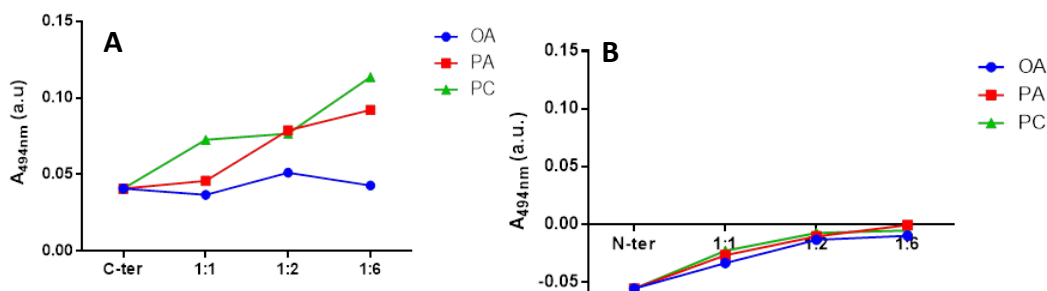


Fig. 9 Caracterización de estructuras β utilizando Rojo Congo. A) Segmento C-terminal interactuando con las vesículas de PC, PC+OA, PC+PA en concentraciones crecientes. B) Segmento N-terminal interactuando con las vesículas de PC, PC+OA, PC+PA en concentraciones crecientes.

Asimismo, con ayuda de geles de gradiente de 0.8-25%, se pudo observar que la combinación tanto con fosfatidilcolina y la combinación con ácido palmítico provocaba una formación de asociaciones lípido-péptido con mayor peso molecular, caso que no ocurrió con el ácido oleico, puesto que logró tener una migración más amplia, por lo tanto sugiere la formación de

estructuras oligoméricas que son de un peso molecular menor comparado con las fibras amiloides (Fig. 10). En este caso, el gel fue procesado mediante una tinción con negro de Sudán.

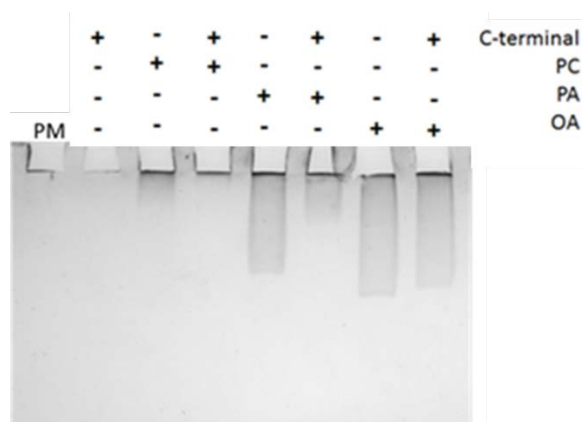


Fig. 10 Gel de gradiente nativo de 0.8-25% teñido con Negro de sudan. Interacción entre el segmento C-terminal y las vesículas de PC, PC+OA, PC+PA.

Como parte de otro modelo experimental se utilizó la línea celular RIN-m5F, la cual es un modelo de células- β de Langerhans que producen insulina de forma nativa, en la cual se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular. Los resultados sugieren que el lípido que causó mayor daño de forma individual fue la preparación con ácido palmítico, mientras que la fosfatidilcolina resultó inocua, por otra parte cuando hay una interacción con el segmento amino disminuye la viabilidad de forma similar a los 3 lípidos evaluados, posiblemente asociado con la formación de estructuras oligoméricas. Al evaluar la interacción con el segmento carboxilo se encontró, que el menor daño fue cuando interaccionó con la fosfatidilcolina, mientras que el mayor daño se presentó al interactuar con las vesículas de ácido oleico (Fig. 11), esto debido a un aumento en la formación de estructuras oligoméricas, las cuales pueden estar causando la formación de poros o disrumpiendo la integridad de la membrana (Ver Fig. 1).

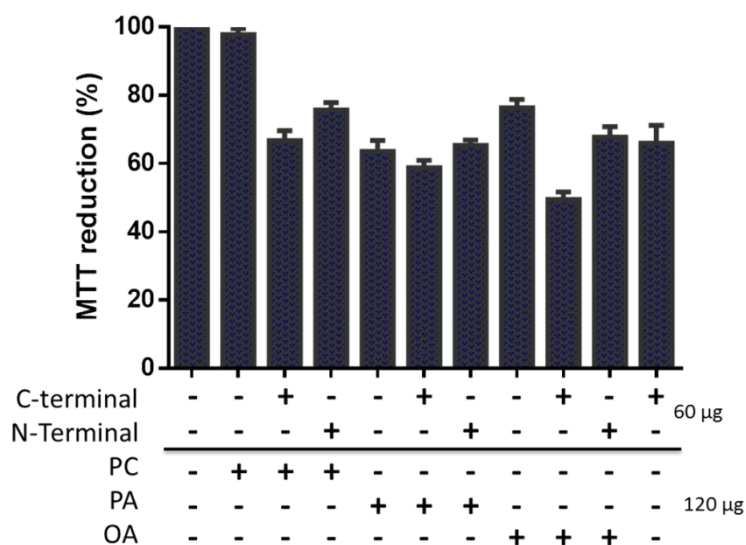


Fig. 11 Ensayo de viabilidad celular. Diferentes tratamientos péptido lípido a los que sometieron las células RIN.

Por otra parte, se realizó una extracción proteica total para caracterizar la activación de la vía UPR en las células RIN, siendo expuestas a estímulos con PC, PA y OA, en una relación 1:2 con los segmentos peptídicos de amilina, en donde se encontraron cambios mínimos en la expresión de ATF6 α y CHOP, sin embargo actualmente continuamos trabajando en esta caracterización experimental.

Así mismo, se caracterizó el comportamiento de la región en la que se encuentra el núcleo de agregación de la amilina, es decir el segmento C-terminal, el cual ha demostrado ser el que presenta una mayor formación de estructuras de tipo beta, además del daño citotóxico ocasionado. Por lo anterior se utilizó la variante F₂₃R en busca de una posible disminución en su tendencia a la agregación y de daño.

10.5 Interacción de la variante F₂₃R y C-terminal.

Como resultado del estudio *in silico* anteriormente descrito, la sustitución F₂₃R en la hIAPP es una nueva variante, la cual está presente en la secuencia de amilina del pez dorado (*Carassius auratus*). Esta variante se eligió entre las demás puesto que elimina el “hot spot” presente en la región C-terminal, la cual se ha descrito como núcleo amilodogénico de la amilina. Además, la variante F₂₃R presentó los valores más negativos en el algoritmo de

Aggrescan, por lo tanto un buen candidato para disminuir la tendencia a la agregación que presenta el segmento carboxilo.

Es importante considerar que la idea de introducir modificaciones en la secuencia de amilina no es algo nuevo, y como ejemplo de esto se puede mencionar a la pramlintida, una molécula la cual está basada en la secuencia de amilina de rata, y que se obtuvo al sustituir por prolinas los aminoácidos en las posiciones 25, 26 y 29 de la amilina humana, con lo que inhibe el proceso de agregación de la pramlintida. Sin embargo hay reportes en los cuales la pramlintida promueve la agregación, debido a que funciona como una estructura de andamiaje para iniciar el proceso de formación de fibras de tipo amiloide en la secuencia nativa (51). Por lo tanto, se evaluó el comportamiento de la variante F₂₃R en conjunto con el segmento carboxilo terminal nativo, bajo condiciones equimolares, utilizando un modelo de células RIN para complementar el estudio *in vitro*.

Dentro de lo más relevante de los resultados obtenidos, se encontró que la variante F₂₃R puede inhibir el proceso de agregación generada por el C-terminal, lo cual se observó por el cambio en la birrefringencia en el ensayo de rojo Congo (Fig. 12 A) y también por la disminución en la fluorescencia al ser acoplada con la sonda de ThT (dato no mostrado). Además, al evaluar la viabilidad celular, la variante F₂₃R no produjo efectos citotóxicos, aunado a este fenómeno, mostró la capacidad de disminuir la citotoxicidad generada por el C-terminal (Fig. 12 B). Ahora bien, con la finalidad de caracterizar la función fisiológica de las células-β, se realizó la cuantificación de insulina del medio extracelular, en donde el segmento C-terminal, a pesar de disminuir la viabilidad celular cerca de un 20%, no mostró alteración alguna en la secreción de insulina. De manera importante, el segmento F₂₃R mostró un incremento del 28% en la secreción de insulina (Fig.12 C).

Por otro lado, los niveles de calcio intracelular forman parte de los mecanismos que controlan la liberación de insulina; dentro de las células-β están presentes 2 sistemas principales de extrusión de Ca²⁺, la bomba de calcio de la membrana plasmática (PMCA) y el transportador Na⁺/Ca²⁺. En este sentido se encontró que tanto el C-terminal y la variante F₂₃R, están asociados

con una regulación a la baja en la expresión de PMCA (Fig. 12 E), lo cual podría estar relacionado con el mantenimiento basal de los niveles de secreción de insulina. De tal manera que cuando las células al encontraron bajo el tratamiento del segmento C-terminal junto con la variante F₂₃R, se incrementó la liberación de insulina.

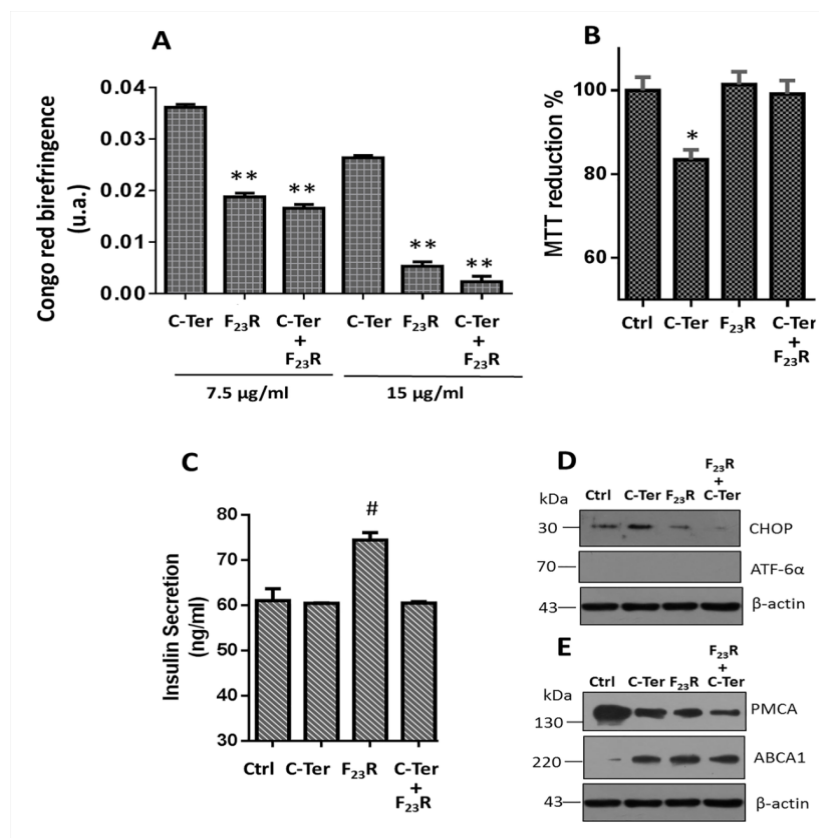


Fig. 12 Comportamiento de la variante F₂₃R y C-terminal. A) Cambio de birrefringencia asociado a la formación de estructuras de tipo β. B) Ensayo de viabilidad celular. C) Secreción de insulina asociada con los diferentes tratamientos. D) Expresión de CHOP y ATF-6α en respuesta a los tratamientos con los péptidos. E) Expresión de PMCA y ABCA1 en respuesta a los tratamientos con los péptidos.

Por otra parte, el tratamiento con el C-terminal y la variante F₂₃R, mostró cambios en la expresión del transportador ABCA1, lo cual sugiere que podría estarse modulando el metabolismo del colesterol sobre la membrana plasmática (Fig. 12 E), siendo esta modulación un mecanismo compensatorio que podría disminuir los niveles de colesterol en la membrana plasmática, para reducir así el daño causado por los amiloides, puesto que se ha descrito al colesterol como un promotor de la formación de fibras amiloides en la amilina humana (37). Por otra parte, alteraciones en el funcionamiento del transportador ABCA1 puede generar una acumulación de colesterol, lo cual se

ha relacionado con una exocitosis alterada de los gránulos de insulina. Así también, un incremento en ABCA1 puede tener una estrecha relación al regular la expresión de PMCA, debido a que forma parte del mecanismo de excreción de insulina. Es muy importante considerar que los niveles elevados de colesterol en la membrana plasmática inducen a la formación de cambios estructurales en la amilina (33), de manera que se podría considerar que el aumento en la expresión de ABCA1 es un mecanismo compensatorio, en el cual las células- β están tratando de disminuir el colesterol de la membrana.

Ahora bien, al caracterizar los transductores de la vía UPR se encontró que hubo un incremento en la expresión de CHOP, el cual fue mayor cuando interaccionó con el C-terminal, sin embargo esta condición disminuyó al tratarse con la variante $F_{23}R$, e incluso al llevar a cabo el tratamiento con los dos péptidos (Fig. 12 D), fenómeno que podría estar asociado a la presencia de la variante $F_{23}R$, la cual inhibe el proceso de amiloidogénesis.

Adicionalmente, se consideró la posibilidad de evaluar los efectos protectores de la variante $F_{23}R$ en otros modelos celulares expuestos de manera natural a las fibras amiloides, con la finalidad de evaluar si el efecto protector de la variante es un mecanismo general. Se utilizó un modelo con células de microglía, que de forma natural se encuentran expuesta a las fibras amiloides, similares a las que se producen con la amilina, pero que en este caso están compuestas por el péptido- β amiloide ($A\beta$). Como resultado de la interacción con el péptido $A\beta$, se encontró una disminución drástica en la viabilidad celular, fenómeno que también se presentó cuando se expusieron al C-terminal (Fig. 13 A); por otra parte, el tratamiento con $F_{23}R$ no afectó en gran magnitud la viabilidad celular. Sin embargo, los tratamientos en donde estuvo presente la variante $F_{23}R$ disminuyeron la síntesis de IL-6 (Fig. 13 B), además de mostrar una activación de CHOP, lo que podría asociarse con un fenómeno protector de la variante $F_{23}R$ (Fig 13 B).

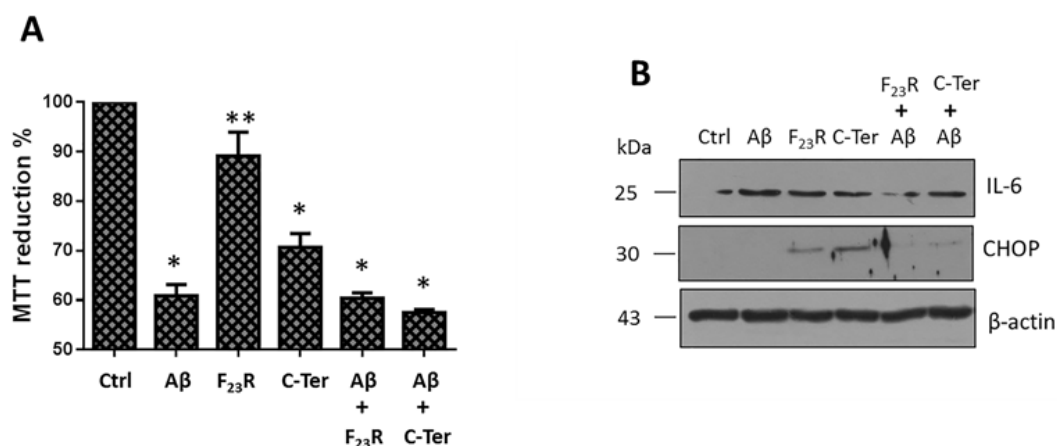


Fig. 13 Efecto de la amilina en un modelo celular de microglía. A) Ensayo de viabilidad celular. B) Expresión de IL-6 y CHOP en respuesta a los tratamientos con los péptidos.

11 Discusión

En primera instancia, los segmentos de las secuencias de amilina presentaron diferentes valores en los parámetros fisicoquímicos, lo cual es un indicativo sobre las posibles interacciones al incubarse con las soluciones lipídicas. Por consiguiente, los resultados obtenidos sugieren la presencia de cambios conformacionales sobre la región C-terminal, al momento que interactúa con las soluciones lipídicas evaluadas, como las de PC, PA, OA y LPA. En este sentido se ha descrito que el plegamiento peptídico puede ser desencadenado por interacciones hidrofóbicas, así como las propiedades electrostáticas entre la interface polar y no polar de las vesículas lípido/proteína, lo que puede jugar un papel clave en la transición y estabilización de los segmentos de la amilina (52). Por otra parte, en un modelo más complejo de membranas similar al de las células- β , el cual contiene fosfolípidos pero sin colesterol, se ha descrito que esta condición puede favorecer la formación de estructuras amiloides en la amilina (38, 39), lo que refuerza los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

Además, el dominio C-terminal presenta una mayor tendencia a formar fibras de tipo amiloide, puesto que es ahí donde se localiza el núcleo amiloidogénico. Sin embargo, se logró disminuir la formación de estructuras amiloides en esta región, al realizar una modificación sobre su secuencia, al

cambiar un residuo de fenilalanina en la posición 23 por arginina. De esta manera, al incubar en conjunto al segmento C-terminal nativo con la variante F₂₃R se logró modular los cambios conformacionales del C-terminal, al inhibirse el proceso de nucleación y formación de fibras amiloides. La generación de nuevas variantes es un punto estratégico en el diseño amiloidomimético con el objetivo de disminuir sus propiedades amiloidogénicas.

De manera más puntual, la variante F₂₃R fue capaz de mejorar el metabolismo celular, debido a que en los tratamientos donde se encontraba presente generó un incremento en la viabilidad celular de las células-β. Además, de manera individual la variante F₂₃R indujo un aumento en la secreción de insulina (Fig. 11 C), sin provocar un daño celular significativo, fenómeno que podría explicarse a través de la modulación en la expresión de PMCA, puesto que este transportador regula al calcio citoplasmático, y por consiguiente la liberación de insulina. Por otra parte, también se ha descrito que una sobreexpresión de PMCA está asociada con el aumento de Ca en el retículo endoplásmico, lo que puede conducir a estrés de retículo en las células beta (53).

Asimismo, uno de los factores de transcripción asociados al estrés de retículo endoplásmico es CHOP, el cual regula la expresión de chaperonas y enzimas redox. Sin embargo, una activación crónica de CHOP causada por estrés de retículo endoplásmico puede desencadenar la apoptosis, debido a la activación de ERO-1α, lo que genera un incremento de hiperoxidación en el lumen del RE y del receptor IP3, y con esto una liberación continua de calcio (54). Además de activar enzimas como la calpaína, que tiene como función la escisión proteolítica de Bcl2 y PMCA. Sin embargo, en los experimentos realizados no se encontraron productos de la degradación de PMCA, lo que sugiere que la regulación de esta proteína se lleva a través de mecanismos transcripcionales. En este sentido, PMCA podría ser mediada por mecanismos asociados con la vía calcineurina/NFAT.

Por otra parte, se observaron resultados que no habían sido reportados previamente dentro de las funciones convencionales de la amilina, como lo es un incremento en la expresión de ABCA1 (Fig. 11 E), el cual es un

transportador de colesterol en las células- β . Este evento podría estar actuando como mecanismo compensatorio, para disminuir la cantidad de colesterol en la membrana plasmática, y aumentar su fluidez, con el fin de evitar el posible daño causado por la interacción péptido/lípido, ya que si la amilina se encuentra en forma de oligómeros o de fibras amiloides, podría llegar a disminuir la integridad de la membrana. Además, en un modelo similar a la membrana plasmática, en donde se utilizaron membranas de PC:PS:COL, se observó una regulación mediada por el colesterol sin importar la carga de la membrana (37).

De igual manera, en otros polipéptidos que tienden a formar fibras amiloides, como el β -amiloide, se ha descrito que las propiedades fisicoquímicas de las membranas que interaccionan con estos péptidos pueden acelerar el proceso de agregación, así como de la formación de fibras (55). Sin embargo, no siempre esta interacción va promover la agregación, ya que también se ha visto que pueden reducir la formación de las fibras de tipo amiloide y por consiguiente disminuir su citotoxicidad. Por lo tanto, cobra gran relevancia el estudio con diferentes combinaciones lipídicas para conocer mejor cómo y con cuál lípido se llevan a cabo las interacciones lípido-péptido.

12 Conclusiones.

En el presente trabajo se estudió el mecanismo de agregación basado en la secuencia de amilina, además mediante el concepto de biomimética, se generaron nuevas variantes de la amilina capaces de reducir la propensión a la agregación. Siendo muestra de ello la variante F₂₃R, la cual fue capaz de disminuir la formación de estructuras de tipo β , así mismo se demostró que podría disminuir los efectos citotóxicos causados por el C-terminal, además de favorecer un aumento en la síntesis de insulina.

También se caracterizaron los mecanismos mediante los cuales los lípidos pueden ser factores promotores de la agregación, y llevar a cabo la modulación lípido-péptido sobre los segmentos de amilina. Dentro de los lípidos evaluados encontramos que de manera dependiente de la concentración, el LPA puede llegar a modular la estructura secundaria del C-terminal, además en el caso de las interacciones con las vesículas de PC con OA o PA también se

observaron cambios dependientes de la concentración, pero de manera más importante logramos observar que cada uno de los segmentos de amilina utilizados (N-terminal, C-terminal y F₂₃R) mostró un comportamiento diferente al estar en presencia de un ambiente lipídico, aportándonos un mejor entendimiento de las condiciones que promueven los cambios conformacionales sobre la amilina.

Los resultados obtenidos marcan una base para seguir avanzado en el campo de estudio de los amiloides, por lo cual se sugiere complementar este estudio mediante un panel más amplio de lípidos, y su modulación sobre los segmentos de amilina. Así también, determinar el comportamiento de nuevas variantes sobre un modelo experimental similar al ya efectuado con la variante F₂₃R, y además utilizar experimentación *in vivo* sobre modelos de murino.

13 Referencias.

1. Sanke T, Bell GI, Sample C, Rubenstein AH, Steiner DF. An islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing. *J Biol Chem*. 1988 Nov 25;263(33):17243-6.
2. Roth JD, Roland BL, Cole RL, Trevaskis JL, Weyer C, Koda JE, et al. Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 20;105(20):7257-62.
3. Potes CS, Lutz TA. Brainstem mechanisms of amylin-induced anorexia. *Physiol Behav*. 2010 Jul 14;100(5):511-8.
4. Trevaskis JL, Parkes DG, Roth JD. Insights into amylin-leptin synergy. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Aug;21(8):473-9.
5. Wielinga PY, Lowenstein C, Muff S, Munz M, Woods SC, Lutz TA. Central amylin acts as an adiposity signal to control body weight and energy expenditure. *Physiol Behav*. 2010 Aug 04;101(1):45-52.
6. 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 Jun;39(6):752-6.
7. Rojas I, Novials A. Amilina: del estudio molecular a las acciones fisiológicas. *Endocrinología y Nutrición*. [10.1016/S1575-0922(01)74399-9]. 2001;48(8):234-45.
8. Shigihara N, Fukunaka A, Hara A, Komiya K, Honda A, Uchida T, et al. Human IAPP-induced pancreatic beta cell toxicity and its regulation by autophagy. *J Clin Invest*. 2014 Aug;124(8):3634-44.
9. Young A. Amylin : physiology and pharmacology. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP; 2005.
10. Westermark P, Andersson A, Westermark GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev*. 2011 Jul;91(3):795-826.
11. Cao P, Abedini A, Raleigh DP. Aggregation of islet amyloid polypeptide: from physical chemistry to cell biology. *Curr Opin Struct Biol*. 2013 Feb;23(1):82-9.
12. 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):2019-35.
13. 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 Apr 26;434(1):54-9.
14. 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 Oct;330(1-2):105-20.
15. Cnop M, Igoillo-Esteve M, Cunha DA, Ladriere L, Eizirik DL. An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans*. 2008 Oct;36(Pt 5):909-15.
16. Eizirik DL, Cnop M. ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. *Sci Signal*. 2010 Feb 23;3(110):pe7.
17. Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med*. 2012;63:317-28.
18. Chambers JE, Marciniak SJ. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 2. Protein misfolding and ER stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Oct 15;307(8):C657-70.
19. Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL. Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2008 Dec;18(6):756-64.
20. Casas S, Gomis R, Gribble FM, Altirriba J, Knuutila S, Novials A. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream endoplasmic reticulum stress response

induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes*. 2007 Sep;56(9):2284-94.

21. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):884-90.
22. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1188-203.
23. Fitzpatrick AW, Debelouchina GT, Bayro MJ, Clare DK, Caporini MA, Bajaj VS, et al. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-beta amyloid fibril. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 02;110(14):5468-73.
24. Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, et al. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature*. 2007 May 24;447(7143):453-7.
25. Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH. Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science*. 2008 Mar 14;319(5869):1523-6.
26. Knowles TP, Fitzpatrick AW, Meehan S, Mott HR, Vendruscolo M, Dobson CM, et al. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1900-3.
27. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jun;15(6):384-96.
28. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*. 2003 Apr 18;300(5618):486-9.
29. Berhanu WM, Hansmann UHE. Inter-Species Cross-Seeding: Stability and Assembly of Rat - Human Amylin Aggregates. *PLOS ONE*. 2014;9(5):e97051.
30. 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;38:125-52.
31. Seeliger J, Weise K, Opitz N, Winter R. The effect of Abeta on IAPP aggregation in the presence of an isolated beta-cell membrane. *J Mol Biol*. 2012 Aug 10;421(2-3):348-63.
32. Wakabayashi M, Matsuzaki K. Ganglioside-induced amyloid formation by human islet amyloid polypeptide in lipid rafts. *FEBS Lett*. 2009 Sep 03;583(17):2854-8.
33. 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 Jun 14;11(9):1280-90.
34. Knight JD, Hebda JA, Miranker AD. Conserved and cooperative assembly of membrane-bound alpha-helical states of islet amyloid polypeptide. *Biochemistry*. 2006 Aug 08;45(31):9496-508.
35. Nath A, Miranker AD, Rhoades E. A Membrane-Bound Antiparallel Dimer of Rat Islet Amyloid Polypeptide. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50(46):10859-62.
36. Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, et al. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*. 2012 Jun 1;336(6085):1168-71.
37. Singh S, Tripathi 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.
38. Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Haring HU, et al. Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Dec 20;299(5):853-6.
39. Hall E, Volkov P, Dayeh T, Bacos K, Rönn T, Nitert MD, et al. Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Medicine*. [journal article]. 2014 June 23;12(1):103.

40. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011 Nov 25;334(6059):1081-6.
41. IAPP [database on the Internet]2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=%28%28%28IAPP%20islet%20amyloid%20polypeptide%29%20NOT%20synthetic%29%20NOT%20PREDICTED%29%20NOT%20PARTIAL>.
42. Mendoza-Espinosa P, Montalvan-Sorros D, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides. *Mol Cell Biochem*. 2014 Aug;393(1-2):99-109.
43. Walsh I, Seno F, Tosatto SC, Trovato A. PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul;42(Web Server issue):W301-7.
44. Baldi P, Brunak S, Frasconi P, Soda G, Pollastri G. Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*. 1999 Nov;15(11):937-46.
45. 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 Aug 27;341(5):1317-26.
46. Tartaglia GG, Pawar AP, Campioni S, Dobson CM, Chiti F, Vendruscolo M. Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. *J Mol Biol*. 2008 Jul 04;380(2):425-36.
47. de Groot NS, Pallarés I, Avilés FX, Vendrell J, Ventura S. Prediction of "hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides. *BMC Structural Biology*. 2005;5:18-.
48. Otzen DE. Amyloid fibrils and prefibrillar aggregates : molecular and biological properties.
49. Ahn JH, Kim MH, Kwon HJ, Choi SY, Kwon HY. Protective Effects of Oleic Acid Against Palmitic Acid-Induced Apoptosis in Pancreatic AR42J Cells and Its Mechanisms. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2013;17(1):43-50.
50. Moravcova A, Cervinkova Z, Kucera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotkova H. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res*. 2015;64 Suppl 5:S627-36.
51. Łoboda D, Rowińska-Żyrek M. Zn(II) - pramlintide: Stability, binding sites and unexpected aggregation. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017 2017/09/01/;174:150-5.
52. Garcia-Gonzalez V, Gutierrez-Quintanar N, Mendoza-Espinosa P, Brocos P, Pineiro 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 Apr;186(1):19-27.
53. Jiang L, Allagnat F, Nguidjoe E, Kamagate A, Pachera N, Vanderwinden JM, et al. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase overexpression depletes both mitochondrial and endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores and triggers apoptosis in insulin-secreting BRIN-BD11 cells. *J Biol Chem*. 2010 Oct 1;285(40):30634-43.
54. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011 Mar;13(3):184-90.
55. Burke KA, Yates EA, Legleiter J. Biophysical Insights into How Surfaces, Including Lipid Membranes, Modulate Protein Aggregation Related to Neurodegeneration. *Frontiers in Neurology*. 2013;4:17.

14 Anexos

Anexo 1. Clasificación de las 240 secuencias de amilina. Se muestra el número de secuencias correspondientes a cada orden filogenético.

Clase	Mammalia	Chordata	Actinopterygii	Aves	Sauropsida	Sarcopterygii
Orden	<i>Afrosoricida</i> 2	<i>Beloniformes</i> 1	<i>Characiformes</i> 3	<i>Accipitriformes</i> 4	<i>Crocodylia</i> 3	<i>Coelacanthiformes</i> 2
	<i>Artiodactyla</i> 11		<i>Clupeiformes</i> 1	<i>Anseriformes</i> 9	<i>Squamata</i> 4	
	<i>Carnivora</i> 12		<i>Cypriniformes</i> 3	<i>Apodiformes</i> 2	<i>Testudines</i> 5	
	<i>Chiroptera</i> 1		<i>Cyprinodontiformes</i> 5	<i>Bucerotiformes</i> 2		
	<i>Cingulata</i> 1		<i>Esociformes</i> 1	<i>Caprimulgiformes</i> 2		
	<i>Dasyuromorphia</i> 1		<i>Lepisosteiformes</i> 1	<i>Cariamiformes</i> 2		
	<i>Dermoptera</i> 1		<i>Perciformes</i> 6	<i>Cathartidae</i> 1		
	<i>Didelphimorphia</i> 2		<i>Pleuronectiformes</i> 1	<i>Charadriiformes</i> 1		
	<i>Lagomorpha</i> 2		<i>Salmoniformes</i> 2	<i>Coliiformes</i> 2		
	<i>Perissodactyla</i> 6		<i>Tetraodontiformes</i> 2	<i>Columbiformes</i> 1		
	<i>Primates</i> 29			<i>Coraciiformes</i> 2		
	<i>Rodentia</i> 23			<i>Cuculiformes</i> 5		
	<i>Scandentia</i> 3			<i>Euripygiformes</i> 2		
	<i>Soricomorpha</i> 2			<i>Falconiformes</i> 2		
	<i>Tubulidentata</i> 1			<i>Galliformes</i> 3		
				<i>Gaviiformes</i> 2		
				<i>Gruiformes</i> 2		
				<i>Leptosomiformes</i> 2		
				<i>Mesitornithiformes</i> 2		
				<i>Otidiformes</i> 2		
				<i>Passeriformes</i> 14		
				<i>Pelecaniformes</i> 6		
				<i>Phaethontiformes</i> 2		
				<i>Phoenicopteriformes</i> 1		
				<i>Piciformes</i> 2		
				<i>Podicipediformes</i> 1		
				<i>Procellariiformes</i> 2		
				<i>Psittaciformes</i> 3		
				<i>Pterocliiformes</i> 2		
				<i>Sphenisciformes</i> 4		
				<i>Strigiformes</i> 2		
				<i>Struthioniformes</i> 5		
				<i>Suliformes</i> 2		
				<i>Tinamiformes</i> 3		
				<i>Trochiliformes</i> 2		
				<i>Trogoniformes</i> 2		
Total	97	1	25	103	12	2

S

Anexo 2. Participación en Simposios y Congresos.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



1^{er} CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS DE LA SALUD

TENDENCIAS DE LA INVESTIGACIÓN EN SALUD

otorgan la presente

CONSTANCIA

a: *Ángel Armando Pulido Capiz*

Coautores: Dr. Víctor García González; por la exposición del trabajo de investigación en modalidad cartel:
Interacciones lipídicas que promueven la formación de estructuras beta en el C-terminal de la Amilina.

Mexicali, Baja California, 10 de junio de 2016
"Por la realización plena del hombre"

M.C.S. Ulises Riecke Campoy
Director de la Facultad de Enfermería

Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántar
Coordinador General del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud



Universidad Autónoma de Baja California
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Otorgan la siguiente constancia a:

ANGEL ARMANDO PULIDO CAPIZ

Por su destacada participación asesorando el cartel:
IMPLICACIONES BIOLÓGICAS EN EL DISEÑO DE MOLÉCULAS
ANÁLOGAS DE AMILINA

En el área de CIENCIAS DE LA SALUD
En el marco del



Tijuana B.C. a 30 de Septiembre de 2016

Patricia Moctezuma Hernández
Dra. Patricia Moctezuma Hernández
Coordinadora de Posgrado e Investigación
Universidad Autónoma de Baja California



Global Agronomics S.A. de C.V.

Otorga la presente

Constancia

A Ángel Armando Pulido Capiz

Por haber ASISTIDO y APROBADO el

CURSO: INTRODUCCIÓN AL MODELAJE MOLECULAR DE PROTEÍNAS

Llevado a cabo del 27 al 29 de abril de 2017 en Querétaro, Qro., México,
con una duración de 40 hrs.

D.C. Ángel Adonai Islas Navarrete
Ponente

Laboratorio de Biofísica, Instituto de Fisiología,
Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico



Miguel
Centro, San
Suchitlan,
Oaxaca C.
Tel.: 951 186 07 26

Ph.D., Agr. Javier López Baltazar
Organizador General
Global Agronomics SA de CV

www.globalagronomics.com

Anexo 3. Envío de Artículo para su publicación.



[About](#) | [Submit](#) | [Journals](#) ▼ | [Research Topics](#)

Search for articles, people, events and more. 

   [Victor](#) 

Author Info ▲

[Why Submit?](#)

[Fees](#)

[Article Types](#)

[Author Guidelines](#)

[Review Guidelines](#)

[Submission Checklist](#)

[Contact Editorial Office](#)

[Submit Manuscript](#)

Manage Articles ▲

[All Articles](#) 1

[In Preparation](#) 0

[Submitted](#) 1

[In Review](#) 0

[Final Validation](#) 0

[Accepted](#) 0

[In Copy-Editing](#) 0

[Copy-Edited](#) 0

[Copy Approved](#) 0

[In Production](#) 0

[Author's Proof](#) 0

[Published](#) 0

[Rejected](#) 0

SUBMITTED

Displayed are the articles you submitted.

Results Per Page
5 Per Page ▼

ALL | A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

Displaying 1 - 1 out of 1 Articles

	Authors and Title	Article Type	Journal / Section	Edited By	Submitted ▼
☐	García González, Pulido-Capiz, ..., Rivero Modulation of amyloidogenesis controlled by the...	Original Research	Cellular Endocrinology		08.02.2018

Displaying 1 - 1 out of 1 Articles

Enter review forum

Modulation of amyloidogenesis controlled by the C-terminal domain of amylin, shows new functions on hepatocyte cholesterol metabolism

Pulido-Capiz A1, Martínez-Navarro I1,2, Guevara-Olaya LA1, Díaz-Molina R1, Mas-Oliva J3 ,
Rivero IA4 and García-González V1*

1 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California 21000. México

2 Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California 21100. México

3 Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México 04510. México.

4 Centro de Graduados e Investigación en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana, Baja California

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

Abstract

The islet amyloid polypeptide hormone (IAPP) or amylin maintains a key role in metabolism, however this 37-residues peptide could form pancreatic amyloids, which is a characteristic feature of type 2 diabetes mellitus (DM2); however, some species do not form amyloid fibril structures. Employing a biomimetic approach, an extensive panel of optimized sequences was generated, which would drastically reduce aggregation propensity. In this sense, structural and cellular characterization performed on the C-terminal domain with the highest aggregation propensity allowed describing an aggregative phenomenon dependent on the lipid environment. Moreover, evaluation of the F23R variant demonstrated inhibition of amyloid formation on the native C-terminal, associated with functional optimization in calcium and cholesterol management coupled to insulin secretion by beta cells, and decreasing cytotoxic conditions in microglia cells, a model of amyloidosis. Additionally, it was found that C-terminal sequences could modulate cholesterol metabolism in hepatocytes by regulating SREBP-2, apoA-1, ABCA1, and LDL-R, mechanism that may represent a new function on the management of cholesterol. While optimized sequences could diminish beta-sheet formation with only one residue modification and represent a novel strategy adaptable to other pharmacological targets, data suggest a new IAPP function associated with metabolic rearrangements of cholesterol in liver.

1. Introduction

Exacerbated perturbation of protein homeostasis (proteostasis) could lead to a phenomenon considered as protein metastasis 1,2, wherein 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 pancreatic islets, wherein insulin synthesis, sensitivity to this hormone in peripheral tissues, and the function of beta cells are affected by the presence of amyloid-like fibrils composed of human amylin (hIAPP).

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; likewise, it has been described as a sensitizer of leptin function 5,6. In addition, data generated by our group suggest a possible regulation of hepatic cholesterol metabolism (personal communication). hIAPP is a monomeric peptide processed in the Golgi apparatus and co-secreted with insulin in response to beta cell secretagogues 7. Structural transitions must be the key in the phenomenon of amyloid fibril formation 8; indeed, 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, wherein the over-activation of the unfolded protein response (UPR) can promote beta cell dysfunction 9. UPR is integrated by a tripartite signaling system, which regulates gene expression to resolve stress and maintain proteostasis. ER stress is detected in the lumen by IRE1, PERK, and ATF6, inducing signaling ER-nucleus cascades, through factors such as N-ATF6, XBP1s, and CHOP 10.

Different variants are involved in alterations of amyloid structures in vivo, for instance, the S20G mutation has been found in Asian populations, associated with early cases of DM2, and accelerating the formation of amyloid structures 11,12, also several variants have been reported in Maori populations of New Zealand 13. Notwithstanding, rat amylin shows a diminished trend to produce amyloid fibrils, the differences among human and rat sequences are six residues (H18R, F23L, A25P, I26V, S28P, and S29P), all of them located in segment 18-29 14. Indeed, several reports suggest that the 23-37 domain may be key in the structural transitions that trigger the formation of amyloid fibrils 14,15.

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 16. The tendency of hundreds of organisms to form IAPP-amyloid structures has not been fully analyzed, therefore the characterization of IAPP sequences can provide a basis for a better understanding of the aggregation phenomenon and for the development of improved sequences that might serve as a source for optimized

pharmacological treatments that may reduce the formation of beta-sheet structures, and, in turn, a detailed understanding of cellular response mechanisms to IAPP.

2. Methods

2.1 Analysis of sequences. Selection of IAPP sequences from hundreds of organisms was performed, wherein some physicochemical parameters were characterized. Association that presents hIAPP sequence with respect to other organisms was described by evaluating the tendency to form misfolded structures, employing multiple predictor algorithms of beta-sheet aggregation and amyloid fibril formation, by the use of several specialized platforms. Through searching in protein database of the NCBI, using the term islet amyloid polypeptide (IAPP), 314 sequences were found, which correspond to 284 eukaryotes, and another 30 associated sequences 17. In this approach, and through different filters we considered only 240 of the 284 that integrate the characterized, predicted and partial sequences.

2.2 Physicochemical parameters. Physicochemical analysis of IAPP sequences was performed, included hydrophobic moment (μH), net electrostatic charge, average hydrophobicity, theoretical average velocity 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 18,19. Additionally, the management of IAPP fragments through the N-domain 1KCNTATCATQRLANFLV17 and C-domain 17VHSSNNFGAILSSTNVGSNTY37 was performed.

2.3. Characterization of aggregation propensity. Several algorithms that enable the identification of regions with a high intrinsic propensity to aggregation were employed. IAPP sequences were characterized through multiple alignments by the use of specialized platforms such as Aggrescan 20, PASTA 2.0 21 and Zyaggregator22,23.

2.4. Phylogenetic tree construction. Sequence similarity search was realized employing the method “Basic Local Alignment Search Tool protein” (BLASTp), which performs protein-protein sequence comparison, and uses heuristics model to generate results 21,24. In addition, other strategies were used to reconstruct the phylogenetic tree as the NJ method and ClustalX software 25,26.

2.5 Sequences designed de novo. Based on network analysis, residues that are different among species were replaced on the sequence of IAPP, and then, the effect of substitution characterized through physicochemical and aggregative parameters. Definition of aggregation propensity range was obtained by consideration of aggregation value of hIAPP as a reference, this based in Aggrescan values (Na4vSS).

2.6 Materials. Cell culture reagents were purchased from Gibco-Invitrogen, while tissue culture plates and other plastic materials were obtained from Nalgene Nunc.

Salts and buffers were obtained from Sigma-Aldrich, as well as thioflavin T (ThT), black Sudan B, Congo-red, SDS and MTT. L- α -phosphatidylcholine (PC), 1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate (LPA) were obtained from Avanti Polar Lipids.

2.7 Peptide synthesis and preparation. Considering the amino acid sequence and physicochemical properties of the IAPP fragments, several peptides were synthesized (GenScript). Specifically, the following sequences were characterized: 1KNTATCATQRLANFLVHSS20 (N-terminal native); 23FGAILSSTNVGSNTY37 (C-terminal native), a region described with a high tendency to aggregation, and 23RGAILSSTNVGSNTY37 (F23R variant). The best condition for peptide solubilization was ultrapure H₂O (0.6 mg/ml), subsequently transferred 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 β) was used as an amyloid structure reference 25GSNKGAIIGLM35.

All solutions were filtered by membranes with a pore size of 0.22 μ m. The lipid effect on peptide structure was performed using ThT-fluorescence, peptide bond spectroscopy and biochemical techniques.

2.8 Lipid vesicles. Lipids were mixed in chloroform and dried for 1 h under a gentle stream of N₂, with an additional period 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 phosphate buffer and subsequently sonicated with 4 cycles of 10 min (15s on/30 s off pulses) in an ice bath under an N₂ flow. Samples were left to equilibrate for 2 h and then centrifuged for 10 min at 13000 rpm. Solution of small unilamellar vesicles obtained was kept at 4°C until use, previously characterized by transmission electron microscopy 19.

2.9 Peptide-bond conformational changes. Experimentation was performed through characterization of absorbance at 218 nm, associated with changes in the conformation of the peptide-bond, which is a parameter of conformational changes in the formation of beta-sheet structures 4,19. Measurements were obtained using a BioRad Smart spectrophotometer with diode array.

2.10 Congo-red birefringence spectroscopy. Assays were performed based on the protocol of 27, and adapted by our group in several reports. Employing 10.6 μ M of Congo-red and 60 μ g/ml of peptides under the different conditions evaluated, the optical density was measured every 2 nm from 400 to 700 nm.

2.11 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 spectrofluorimeter.

2.12 Circular dichroism. CD 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 µg/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 are reported as mean molar ellipticity (deg cm² dmol⁻¹).

2.13 Lipid-peptide interactions. Lipid/peptide samples were analyzed on non-denaturing electrophoresis, technique adapted by our group in lipid-peptide characterization 28. We established a new methodology through the use of 0.8–15 % gradient gel electrophoresis. Later, gradient gels were stained with Sudan-black and silver protocols, according to previous work 29.

2.14 Cell Culture. RIN-m5F beta cells (Langerhans islets, ATCC) were grown 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 use hepatocytes (C9) in DMEM medium with FBS 10 %. Penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50 g/mL) were added to the media.

2.15 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 20000 cells/well and allowed to grow to 90 % confluence. Next, culture medium was replaced with Opti-MEM medium. After 1 h under this condition, cells were incubated under different treatments, and subsequently processed according to previous protocols 4.

2.16 Western blot. In the evaluation of cholesterol metabolism and UPR pathways, 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 45 min at 4°C. Further to centrifugation at 8500 rpm for 8 min, the supernatant was recovered and the protein quantification was carried out using the bicinchoninic acid procedure. Samples (20 µg/lane) from the total protein fraction were analyzed by SDS–PAGE on 10 % gels further transferred to PVDF membrane. Membranes were incubated with primary antibodies: anti-PMCA-ATPase, anti-CHOP, anti-IL-6, anti-rLDL, anti-SREBP2, ANTI-CD47, anti-ABC1, anti-apoA1, anti-β-actin, anti-ATF6a AND anti-XBPIs. Incubation with respective secondary antibodies anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG and anti-goat IgG coupled to horseradish peroxidase (HRP) for 1 h at 37°C was carried out, and then HRP activity was detected.

2.17 Determination of insulin. Supernatant media of RIN-m5F cells under different treatments were recovered and then centrifuged at 5000 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.

2.18. Calcium characterization. Cells incubated with different treatments were removed from dishes and washed with PBS. Cellular suspensions were incubated with 3 μ M of fura-2AM in PBS for 1 h at 37°C, further to centrifugation and several steps of washes, measures were performed in a 1 cm quartz cuvette, on a Cary Eclipse spectrofluorimeter, with an excitation wavelength at 340 and 380 nm, and emission registered at 510 nm.

3. Results

3.1 Importance of region 17-31 in IAPP sequences

A panel of 240 IAPP sequences was selected according to the criteria described in methods, the most important groups are 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 (Sup table 1). Alignments in 240 IAPP sequences suggests that the N-terminal domain (1-17 residues) was conserved in almost all sequences, showing minimal changes (Fig.1A), wherein the highly conserved residues were C2, L12, and L16. However, some positions showed the highest number of variants among species, such as residue S29 with 211 sequences, H18 with 209, F23 with 206, and A8 with 168 (Table 1). The region 17-31 concentrated 74% of total variants (1187 of 1640), 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, whereas the C-domain was restricted to phylogenetically close groups (Sup figure 1). Indeed, the C-terminal domain of hIAPP has been described with major structural modifications, and possibly a domain wherein conformational changes to beta-sheet formation occur. Specifically, region 23-31 represents the site wherein protein frustration phenomenon takes place, indicating that it could be key for the binding of ligands 30,31. Thus, residue modifications in this region could reduce the phenomenon of protein frustration, originating a stable core of protein folding and slowing down interactions among monomers.

3.2. Characterization of the propensity to amyloid structure formation

A specific pattern was identified in the analysis of hydropathy values regarding the aggregation propensity index obtained with the AGGRESCAN algorithm (Na4vSS value), wherein a correlation among the values of these variables was found (Pearson 0.82) (Fig.1B). This association was not displayed when values of parameters, such as μH , 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), *Ovis aries* (-13.7), and *Sus crofa* (-13.4) showed the lowest aggregation values (Sup table 2). 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 (Fig. 1C). With the use of algorithms such as PASTA 2.0 and Zygaggregator, similar results were obtained. Importantly, through the analysis of sequences, we found 113 different residue variants in comparison to hIAPP (Table 1). In region 17-31, changes of Ser and Asn were more abundant, likewise 60% of the substitutions were concentrated in this region. Considering these data, the replacement of each of the 113 variants in their respective position in the hIAPP sequence was characterized (Fig. 2A).

Taking as reference the Na4vSS value of hIAPP (-5.6), 43% of sequences decreased the tendency to aggregate, which could modify the nucleation phenomenon in IAPP monomers. Similarly, when AGGRESCAN and hydropathy values were evaluated together, a correlation value of 0.87 (Pearson) was found (Fig. 2B); in other physicochemical parameters there was not a significant association. AGGRESCAN analysis in 113 new sequences suggests a sigmoidal behavior (Fig. 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 V17D, F23R, F23G, I26A could delete any of the hot spots (Table 2). In general, when positions 17, 23, 25, 26, and 32 in hIAPP are modified, the tendency to aggregation is reduced.

3.3. Proposal of de novo sequences

Pramlintide based on rat IAPP sequence (rIAPP) is administered in diabetes therapeutics and considered a non-aggregating peptide 32; however, this de novo design could not represent the best strategy. In the analysis of pramlintide with three substitutions, a value of -6.6 (Na4vSS) was registered, and rIAPP presents -8.8, moreover incubation of equimolar concentrations of rIAPP and human amylin 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, 15 of these data show less aggregation than rIAPP, with a single residue substitution in hIAPP. 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 *H. sapiens*, sequences such as *S. araneus* (AGGRESCAN -15.7) with 6 variants, *B. mutus* (-15.2) with 10, and *O. rasmarus* (-14.1) with 4 variants had the least tendency to aggregation (Sup table 2), contrasting significantly with de novo sequences with only two substitutions, such as V17D_F23R (AGGRESCAN -22.9), V17D_L27H (-21.3), V17D_F23G (-21), V17D_V32G (-20.6), or F23R_L37H (-20.2), even more, variants V17D_F23R and V17D_F23G could delete steric zippers (Fig. 2D). In this sense, modifications that are close to positions 17 and 23 present a lower aggregation propensity, and replacements by polar residues such as Asp and Arg are the most effective to reduce aggregation. Indeed, in the evaluation of sequences with three variants, data contrast significantly with pramlintide and rat values, obtaining 644 new sequences less prone to aggregation (data not shown).

3.4. 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. nancymae*, and *P. alecto*. Only for a group of 15 selected variants, changes that induce a greater propensity to aggregation were N22I (2.9 Na4vSS), N31V (2.3), N35Y (1.1), T4I (0.9), R11W (0.6), and S19F (0) (Table 2), 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. A single variant 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 are 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 concept of subtle modifications in the native C-terminal domain of hIAPP that could reduce the aggregation propensity and modulate the deleterious effects of beta-sheet formation, the domain that intrinsically shows the highest aggregation tendency was evaluated, using the variant F23R as a peptide reference (Fig. 3A), considering its location in the aggregation core and that it is one of the variants that may induce a lower aggregation propensity (Table 2). Native C-terminal was a suitable model, intrinsically showing a high tendency to formation of beta-sheet structures, with the emission ThT-fluorescence spectrum peak at 494 nm, consistent with previous reports 35. However, in the case of the F23R variant, there was a significant diminution in the formation of this type of structures (Fig. 3A). Complementary experiments through characterization with 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 (Fig. 3B). In parallel, these results were confirmed with Fourier-transform infrared spectroscopy (data not shown). In

addition, when the fragment corresponding to the N-terminal domain (residues 1-17) was characterized, no significant changes were 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 molecular conditions that trigger the pathophysiological phenomena associated with DM2 36, such as diminution in the cell mass of Langerhans islets. Thus, employing a beta cell model (RIN-m5F), increasing concentrations of peptide fragments were evaluated with the MTT assay, where only the C-native fragment showed conditions of cytotoxicity starting with the lowest concentration evaluated (7.5 µg/ml). Low percentages of β -secondary structures were found in F23R, inducing minimum levels of cytotoxicity (Fig. 3C). Indeed, localized changes in secondary structure of proteins explain conditions such as activation of the function or protein folding, phenomena dependent on the surrounding lipid microenvironment 4,19. We have characterized these conditions in proteins that show lipid-binding properties 37, and proposed that lipid-protein interactions are critical in conformational changes that can lead to misfolding. In this sense, a lipid microenvironment-dependence of the structure of IAPP sequences was evaluated (Fig. 4).

3.5 Effect of lipid environment on secondary structure

C-terminal and F23R peptides were incubated with neutral unilamellar vesicles composed of PC; the presence of conformational transition towards formation of beta-sheet structures was found in the native C-terminal starting at the lowest concentration, specifically in the peptide-lipid 78 µM/39 µM relationship (Fig. 4A, B), which is close to the critical micelle concentration of PC. This phenomenon did not occur when the variant F23R was evaluated (Fig. 4C, D). These findings may be associated with the low stability of the C-native sequence and its high propensity to aggregation, considering that the membrane environment may enhance aggregation, and subtle changes, such as the F23R in the domain of greater aggregation, would 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 triggering amyloid formation are primarily dependent on the negative charge of lipid surfaces, both in the native C-terminal and F23R variant (personal communication).

Complementarily, in the peptide-bond conformation a dependence of the lipid environment was observed only in the native C-domain (Fig. 5A), and confirmed with the birefringence changes evaluated with Congo-red spectroscopy (Fig. 5B), indicating a high presence of beta-sheet structures dependent on PC. Likewise, this association 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 (Fig. 5C). These changes were not observed when the F23R variant was evaluated. Through a standardized assay that evaluates lipid-peptide interactions, samples were processed through native polyacrylamide gradient gels, which evidenced the native interaction among PC vesicles with the C-terminal, a condition that decreased in the F23R variant (Fig. 5D, E).

Indeed, F23R and the C-terminal do not change substantially with respect to the average hydrophobicity, however when parameters such as the AGGRESCAN values are considered, the native C-domain shows a value of 6.6, but the F23R variant was -5.3, suggesting a very low tendency to aggregation. This condition determined by electrostatic charges may explain the high aggregation propensity, for instance, the C-terminal at a pH range of 3.0-8.5 shows a net charge of zero suggesting an intrinsic tendency to aggregation, which has already been widely discussed in several reports as a serious problem in the therapeutics of IAPP 38. However, under this same range, the charge of the variant F23R is around +1, therefore, a subtle balance among the highly dynamic secondary structure of the C-terminal domain of IAPP, the net charge, and the physicochemical characteristics of the surrounding lipid microenvironment defines the type of secondary structure acquired.

3.6 Inhibitory mechanism of the F23R variant on the C-terminal hIAPP aggregation

Taking into account 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 F23R under equimolar conditions. Results suggest that the variant F23R can inhibit amyloid aggregation in the C-terminal, characterization based on the change of birefringence with Congo-red (Fig. 6A) and ThT-fluorescence (data not shown). Importantly, when cell viability was evaluated, F23R did not induce cytotoxic effects on beta cells, and additionally showed the property of avoiding cytotoxicity exerted by the native C-terminal (Fig. 6B). To characterize the physiological function, insulin secretion was quantified. Although the C-terminal induces a decrease of approximately 20% in cell viability, it does not alter insulin release (Fig. 6C), but surprisingly the F23R variant induces an increase of 28% on secreted insulin levels (Fig. 6C). These data suggest that F23R could stimulate the optimal function of beta cells. We have shown that amyloid aggregation is a phenomenon that induces activation of the UPR transducers. In this regard, treatment with the C-terminal favors an increase in the expression of CHOP transcription factor dependent on PERK activation, but not ATF6- α activation, a condition that does not occur with F23R incubation or under treatment with two fragments (Fig. 6D), conditions associated with the protection phenomenon of F23R.

Although the mechanism that controls the release of insulin has been described extensively through the ATP-sensitive potassium channel, other mechanisms can also play an important role. Indeed, beta cells express a double system for Ca²⁺ extrusion:

plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) and $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange transport system 39; therefore, disposal of calcium is modulated by mechanisms highly regulated. In this sense, we found that the C-terminal fragment and F23R variant could have a connection with a down-regulation in PMCA expression (Fig. 6E), associated with maintaining basal insulin-secretion levels and, specifically under treatment with F23R, allowing an optimized increase. Therefore, amylin through the modulation of the PMCA expression could exert a mechanism in the regulation of cytoplasmic calcium, and, in turn, modulate the release of insulin (Fig. 6C). Indeed, PMCA overexpression is associated with ER Ca^{2+} depletion leading to ER-stress in beta cells 40.

The canonical apoptosis pathway due to high levels of CHOP activate the ER oxidoreductin-1 α (ERO-1 α), generating an increase in ER lumen hyperoxidation and, subsequently, of the IP3 receptor, causing a continuous release of calcium 41, and then activation of enzymes, such as calpain, which could process the proteolytic cleavage of Bcl-2 and PMCA 42. In our experiments, when this possibility was evaluated, degradation products were not registered in the PMCA characterization, suggesting that regulation is exerted 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 suggest that treatment with the C-terminal and F23R variant could modulate the cholesterol metabolism in beta cells through switching the ABCA1 transporter (Fig. 6E). This response to the modulation of the transporter can function as a compensatory mechanism that can lower cholesterol levels 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. Thus, the increase in ABCA1 could be associated with the maintenance of 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 vital functions.

Additionally, we evaluated the possibility of protection mechanisms employing the F23R sequence in other cellular models that are physiologically exposed to amyloid fibrils. Using A β -peptide as an amyloid reference sequence, a drastic decrease in cell viability of microglia was registered, a phenomenon that was also present in C-terminal treatment (Fig. 7A). Importantly, F23R treatment did not affect the viability of microglia. It should be noted that unlike Langerhans beta cells, equimolar treatment with F23R was not able to avoid damage of amyloid structures, considering that microglia is a sensitive model for proteostasis disruption. However, treatments with F23R induce a lower synthesis of the pro-inflammatory cytokine IL-6 (Fig. 7B). CHOP is a transcription factor that regulates the expression of chaperones and redox enzymes,

however under chronic over-activation of ER stress, it can be a trigger of apoptosis². Under our 12-h treatment in microglia, the activation of CHOP by IAPP could be associated with protective phenomena (Fig. 7B).

3.7. Regulation of cholesterol metabolism in hepatocytes

Hepatocytes (C9 cells) that intrinsically show low levels of CHOP expression were evaluated. Using the same scheme of peptide treatments no response was found in the activation of CHOP, and IL-6 synthesis was not even recorded, instead ATF-6 α was activated, which is associated with minimal affectation in cell viability (Fig. 8 A, B). Therefore the fragments do not induce severe ER stress conditions. However, when characterization of several targets involved in cholesterol metabolism was performed, it was found that regardless of the IAPP variants evaluated, peptides could modulate cholesterol metabolism, through activation and increased expression of transcriptional factors that regulate expression of key protein targets of cholesterol metabolism, such as SREBP-2. This mechanism is activated via COPII vesicles for the transport from RE to the Golgi apparatus, similar to ATF-6 α . In turn, this phenomenon is associated with increased expression of the LDL receptor (Fig. 8C).

Likewise, these conditions promote the expression of apoA-1, the major protein component of atheroprotective high-density lipoproteins. Importantly, there is a decrease in the expression of the ABCA1 transporter (Fig. 8B). In contrast to beta cells, cholesterol maintenance is associated with an increase in PMCA levels (Fig. 8D), which promotes a differential regulation of cytoplasmic calcium, in connection with cholesterol metabolism. In general, these results suggest that IAPP could regulate through its C-terminal the management of hepatic cholesterol by the activation of mechanisms that allow an increase in cellular levels. Therefore, this metabolic modulation could be associated with IAPP-mediated atheroprotective functions. In this sense, possibly one of the control mechanisms in expression of these targets may be due to the function of long non-coding RNAs, such as DYNLRB2-2:1, LeXis or APOA1-AS 46,47(48, which we are studying currently.

4. 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, and in particular with the function and stability of the domain of greater aggregation in the IAPP, incubation of the new F23R variant could modulate conformational rearrangements in the native C-terminal, and delete the processes of fibril formation; in turn, representing a strategic point for the amylinomimetic design, and, as a consequence, for metabolic management.

New approaches to understand the sequences prone to aggregation and, therefore, modulation of toxic-aggregate formation must be aimed at acquiring knowledge on the behavior of IAPP in different species. Therefore, generation of stable IAPP analogs may represent a response as a possible treatment for the regulation of glucose metabolism, and as we have documented throughout the work on cholesterol metabolic management. A biology-based strategy can provide a comprehensive solution to design optimized sequences based on IAPP, increasing the alternative of treatments. Evolutionary parameters and a functional-structural focus have led to the generation of several de novo IAPP sequences, and the proposal could be extended to other targets with a high propensity to aggregation.

Abnormalities of cholesterol metabolism may contribute to the impairment of beta cell function in diabetes 49, our data suggest that the C-terminal and specifically the F23R variant could decrease cholesterol levels in the membrane through ABCA1. In contrast, results of the hepatic model suggest the presence of a mechanism that allows the accumulation of cholesterol through increased expression of the main HDL protein, apoA-1, activation of factor SREBP2, as well as the down-regulation of ABCA1, phenomena that suggest a new function in IAPP. Therefore, it is highly possible that tissue-specific regulation by IAPP is present.

Moreover, compensatory mechanisms that, at first instance, are designed to conserve homeostasis are presented. The F23R variant is an important proposal considering it would favor a conformational rearrangement in the IAPP C-terminal that inhibits fibril formation processes, representing a strategic point for amylinomimetic design and, consequently, for the metabolic management. The F23R variant has been described only in the sequence of *Carassius auratus*, therefore de novo sequence with only one substitution could represent an optimized treatment, with a reduction in adverse effects due to immunologic activation mechanisms. For instance, in our conditions, evaluating beta cells, the F23R showed inhibitory properties of template mechanisms that trigger amyloid fibril formation in the native C-terminal domain, in turn optimizing the conservation of key functions such as insulin secretion. And importantly in hepatocytes, F23R induced the metabolic rearrangement through the modulation of cholesterol flow, which could have an impact on cardiovascular risk by favoring LDL endocytosis and an increase of the pre- β HDL release.

Our work presents a new approach for the understanding of strategies that can modulate the folding of sequences with a high propensity to aggregation through a biomimetic approach. Data suggest that regions with a high intrinsic propensity to aggregation tend to be protected by diverse strategies to modulate this phenomenon, indicating the existence of evolutionary factors of resistance to aggregation 50; hence, adaptation and modulation of these phenomena is critical. Therefore, we are currently working on the chemical optimization of the structure of these peptides, which may increase their thermodynamic stability. We are

currently at the tip of the iceberg about the possibilities of sequences generated de novo, in turn, as a source of inspiration for the development of therapeutic strategies.

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

Author contributions: Conceived and designed the experiments: A. P.-C., I.M.-N. and V.G.-G. Performed experiments: A. P.-C., I.M.-N., L.A.G.-O. and V.G.-G. Analyzed data: R.D.-M., J.M.-O., I.A.R., A.P.-C., I.M.-N. and V.G.-G. Contributed reagents/materials/analysis tools: V.G.-G. Wrote the paper: A. P.-C., I.M.-N. and V.G.-G.

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

5. References

- 1 Lee, J. & Ozcan, U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem* 289, 1203-1211 (2014).
- 2 Diaz-Villanueva, J. F., Diaz-Molina, R. Garcia-Gonzalez, V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *Int J Mol Sci* 16, 17193-17230 (2015).
- 3 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* 330, 105-120 (2009).
- 4 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* 12, 2019-2035 (2011).
- 5 Koda, J. E. et al. Amylin concentrations and glucose control. *Lancet* 339, 1179-1180 (1992).
- 6 Percy, A. J., Trainor, D. A., Rittenhouse, J., Phelps, J. Koda, J. E. Development of sensitive immunoassays to detect amylin and amylin-like peptides in unextracted plasma. *Clin Chem* 42, 576-585 (1996).
- 7 Novials, A., Sarri, Y., Casamitjana, R., Rivera, F. Gomis, R. Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes* 42, 1514-1519 (1993).
- 8 Sanke T, Bell GI, Sample C, Rubenstein AH, Steiner DF. An islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing. *J Biol Chem.* 263, 17243-17246. (1988).
- 9 Cao, P., Abedini, A., Raleigh, D. P. Aggregation of islet amyloid polypeptide: from physical chemistry to cell biology. *Curr Opin Struct Biol* 23, 82-89 (2013).
- 10 Walter, P., Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-1086 (2011).
- 11 Butler, P. C. et al. Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes* 39, 752-756 (1990).
- 12 Kautzky-Willer, A. et al. Elevated islet amyloid pancreatic polypeptide and proinsulin in lean gestational diabetes. *Diabetes* 46, 607-614 (1997).

- 13 Poa, N. R., Cooper, G. J., Edgar, P. F. Amylin gene promoter mutations predispose to Type 2 diabetes in New Zealand Maori. *Diabetologia* 46, 574-578 (2003).
- 14 Berhanu, W. M., Hansmann, U. H. Inter-species cross-seeding: stability and assembly of rat-human amylin aggregates. *PLoS One* 9, e97051(2014).
- 15 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* 140, 176-192 (2017).
- 16 Sekar, B. et al. Fabrication of a biomimetic ZeinPDA nanofibrous scaffold impregnated with BMP-2 peptide conjugated TiO₂ nanoparticle for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* (2017).
- 17 NCBI. IAPP [database on the Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=%28%28%28IAPP%20islet%20amyloid%20polypeptide%29%20NOT%20synthetic%29%20NOT%20PREDICTED%29%20NOT%20PARTIAL> (2017).
- 18 Mendoza-Espinosa, P. et al. Microenvironmentally controlled secondary structure motifs of apolipoprotein A-I derived peptides. *Mol Cell Biochem* 393, 99-109 (2014).
- 19 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* 434, 54-59 (2013).
- 20 Conchillo Solé O, et al. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* (2007).
- 21 Walsh, I., Seno, F., Tosatto, S. C. & Trovato, A. PASTA 2.0: an improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic Acids Res* 42, W301-307 (2014).
- 22 Tartaglia, G. G. & Vendruscolo, M. The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chem Soc Rev* 37, 1395-1401(2008).
- 23 Baldi, P., Brunak, S., Frasconi, P., Soda, G. & Pollastri, G. Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* 15, 937-946 (1999).
- 24 Chris Maloney, E. S., Christopher Kelly, Rebecca Orris, and Jeffrey Beck. & NCBI. (ed Bethesda (MD) (2013).
- 25 Larkin, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948 (2007).
- 26 Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A. L., Jacq, B. & Christen, R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7, 439 (2006).
- 27 Klunk WE, J. R., Mason RP. Quantifying amyloid beta-peptide (A β) aggregation using the Congo red-A β (CR-a β) spectrophotometric assay. *Anal Biochem.* 266, 66-76 (1999).
- 28 Benkato, K. et al. Evaluation of Thermal Stability of RNA Nanoparticles by Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Native Condition. *Methods Mol Biol* 1632, 123-133 (2017).
- 29 García-González, 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.* 5 (2015).
- 30 Jenik, M. et al. Protein frustratometer: a tool to localize energetic frustration in protein molecules. *Nucleic Acids Res* 40, W348-351 (2012).
- 31 Eisenberg, D. & Jucker, M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148, 1188-1203 (2012).
- 32 Singh-Franco, D., Robles, G. & Gazze, D. Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 29, 535-562 (2007).
- 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.* 54, 6704-6711 (2015).
- 34 Chandra, B. et al. Stereoisomers Probe Steric Zippers in Amyloid-beta. *J Phys Chem B* 121, 1835-1842 (2017).

- 35 Peccati, F. et al. Binding of Thioflavin T and Related Probes to Polymorphic Models of Amyloid-beta Fibrils. *J Phys Chem B* (2017).
- 36 Khemtemourian, L., Killian, J. A., Hoppener, J. W. & Engel, M. F. Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res* 2008, 421287 (2008).
- 37 García-González, et al. Key structural arrangements at the C-terminus domain of CETP suggest a potential mechanism for lipid-transfer activity. *J Struct Biol.* 186, 19-27 (2014).
- 38 Smaoui, M. R. & Waldispuhl, J. Computational re-engineering of Amylin sequence with reduced amyloidogenic potential. *BMC Struct Biol* 15, 7 (2015).
- 39 Herchuelz, A., Kamagate, A., Ximenes, H. & Van Eylen, F. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in beta cell function and death. *Ann N Y Acad Sci* 1099, 456-467 (2007).
- 40 Jiang, L. et al. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase overexpression depletes both mitochondrial and endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores and triggers apoptosis in insulin-secreting BRIN-BD11 cells. *J Biol Chem* 285, 30634-30643 (2010).
- 41 Tabas, I. & Ron, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13, 184-190 (2011).
- 42 Bruce, J. I. E. Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium* (2017).
- 43 Boczek T, L. 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* 1860, 502-515 (2017).
- 44 Wijesekara, N. et al. ABCA1 deficiency and cellular cholesterol accumulation increases islet amyloidogenesis in mice. *Diabetologia* 59, 1242-1246 (2016).
- 45 Kruit JK, et al. Islet cholesterol accumulation due to loss of ABCA1 leads to impaired exocytosis of insulin granules. *Diabetes* 60, 3186-3196 (2011).
- 46 Hu YW, 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* 55, 681-697 (2014).
- 47 Tontonoz, P. et al. Long Noncoding RNA Facilitated Gene Therapy Reduces Atherosclerosis in a Murine Model of Familial Hypercholesterolemia. *Circulation* 136, 776-778 (2017).
- 48 Halley, P. et al. Regulation of the apolipoprotein gene cluster by a long noncoding RNA. *Cell Rep* 6, 222-230 (2014).
- 49 Cochran, B. J. et al. Erratum. Impact of Perturbed Pancreatic beta-Cell Cholesterol Homeostasis on Adipose Tissue and Skeletal Muscle Metabolism. *Diabetes* 2016;65:3610-3620. *Diabetes* 66, 560 (2017).
- 50 Tartaglia, G. G. et al. Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. *J Mol Biol* 380, 425-436 (2008).

Figures and tables

Fig 1. Analysis of primary structure of IAPP between species. **A)** Evaluation of multiple alignments of 240 sequences showing the conserved sites (black). **B)** Correlation analysis among aggresscan and hydrophaty values of sequences. **C)** Distribution of aggresscan values throughout 240 sequences of IAPP. Negative values are associated with lower aggregation propensity, and positive values with higher aggregation propensity. Black line represents hIAPP.

Fig 2. Single modifications on hIAPP could originate 113 *de novo* sequences modulating the amyloid aggregation in IAPP. **A)** Effect of residue substitution on the human sequence (residues 1-37), showed by the aggresscan values. Orange variants in region 17-31 are identified; black bar corresponds to hIAPP. **B)** Association of hydrophaty and aggresscan values of 113 variants. **C)** Sigmoidal trend was registered in aggregation values of 113 *de novo* variants. **D)** Sequences of species with low aggregation tendency in contrast to less aggregative sequences *de novo* with two substitutions. hIAPP was used as a reference, in red are identified the variants.

Fig 3. The F₂₃R variant modulates beta-sheet structure formation in C-terminal 23-37 IAPP 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-5mF cells under increasing concentrations of peptides. Mean values are presented (n=6, X ± SD) *p<0.001, **p<0.005.

Fig 4 Effect of PC vesicles on secondary structural changes in peptides derived from IAPP. **A)** Fluorescence values at 482 nm in the native C-terminal incubated with PC vesicles. **B)** Under the same conditions, the emission spectra are shown. **C)** Fluorescence values in the F₂₃R variant incubated with increasing concentrations of PC. **D)** Under the same conditions the emission spectra were obtained.

Fig 5. F₂₃R inhibits conformational changes towards the formation of beta-structures in the C-terminal of IAPP. **A)** Evaluation of peptide-bond conformational changes in the native C-terminal and F₂₃R in increasing PC concentrations. **B)** Under the same conditions, values of birefringence changes by Congo-red assay. **C)** Effect of treatment with PC on the kinetics of aggregation. Characterization of lipid/peptide interactions by native polyacrylamide gradient gels (1-15 %) and processed by silver **(D)** and Sudan black **(E)** staining.

Fig 6. Modulation of amyloid aggregation in native C-terminal dependent of treatment with F₂₃R. **A)** Characterization of beta-sheet structures through Congo-

red birefringence assay under equimolar concentrations of peptides. **B)** Beta-cell viability assay by MTT at peptide concentrations of 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **C)** Insulin quantification in extracellular media under the same conditions. Expression of CHOP and ATF-6 α transcription factors (**D**), as well as PMCA and ABCA1 (**E**). β -actin was used as a load control. Mean values are presented ($n=6$, $X \pm \text{SD}$) * $p<0.001$, ** $p<0.005$, # $p<0.01$.

Fig 7. Functional modulation of IAPP sequences in microglia. **A)** Responses of cytotoxicity obtained in the microglia model, using the A β -peptide as reference. **B)** Under the same treatments CHOP and IL-6 was evaluated. β -actin was used as a control. ($n=6$, $X \pm \text{SD}$) * $p<0.001$, ** $p<0.05$.

Fig 8. IAPP sequences modulate cholesterol metabolism. **A)** Hepatocytes were treated with equimolar concentrations of peptide variants, and MTT assay was performed, as well as CHOP, IL-6 and ATF-6 α were evaluated (**B**). **C)** Under the same conditions, proteins that control cholesterol metabolism were characterized. **D)** Western-blot of PMCA. Peptide concentration was 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ incubated during 12 h. β -actin was used as a control.

Fig. 1

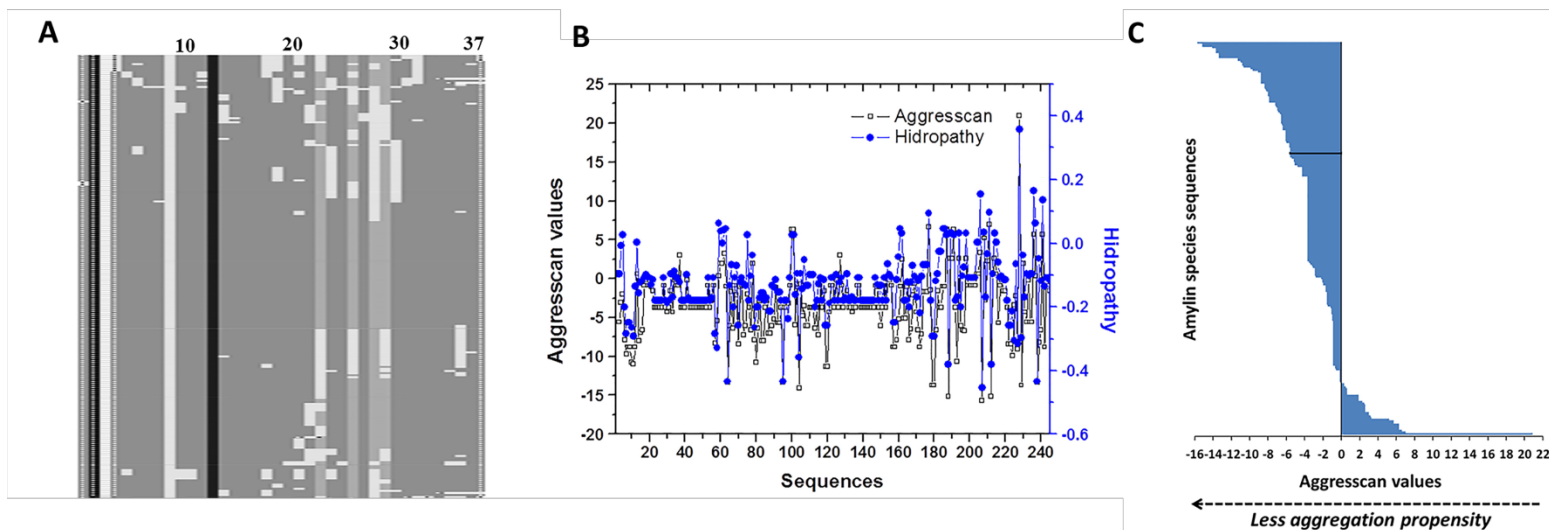


Fig. 2

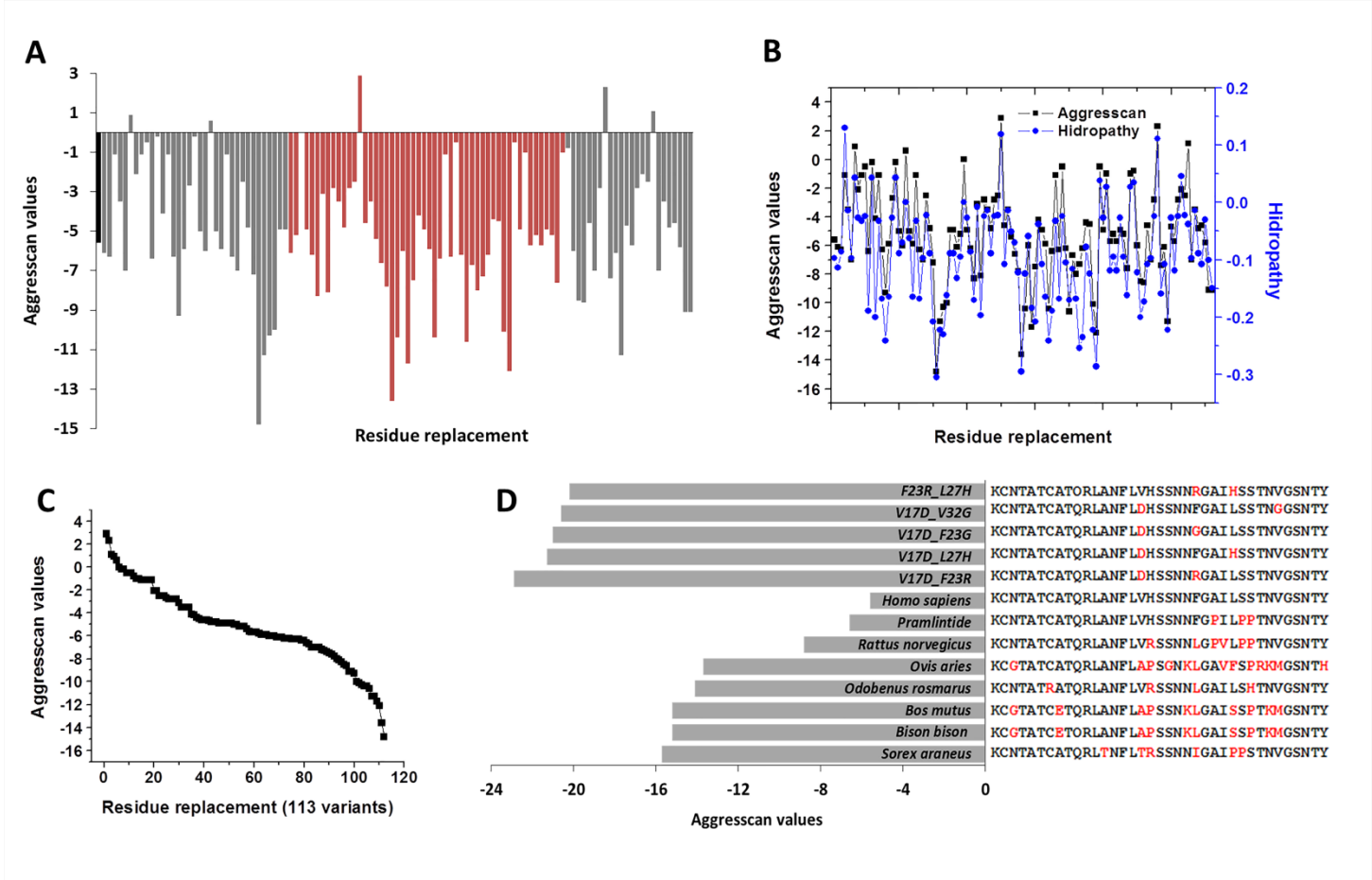


Fig. 3

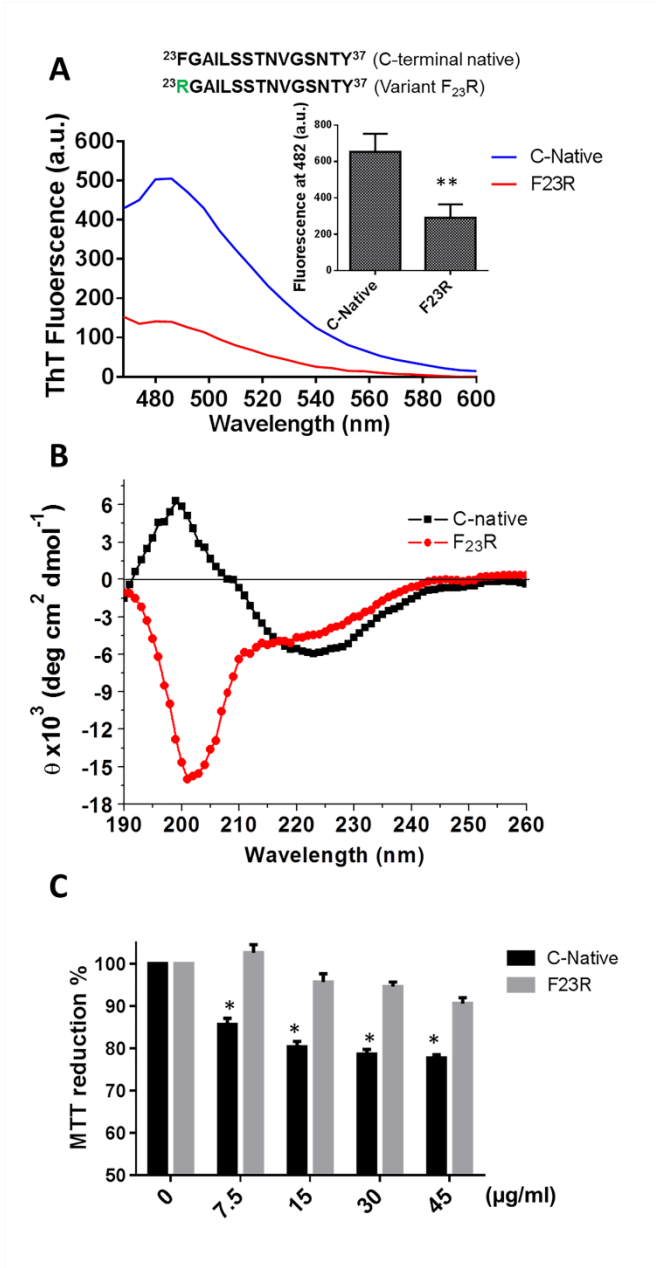


Fig 4.

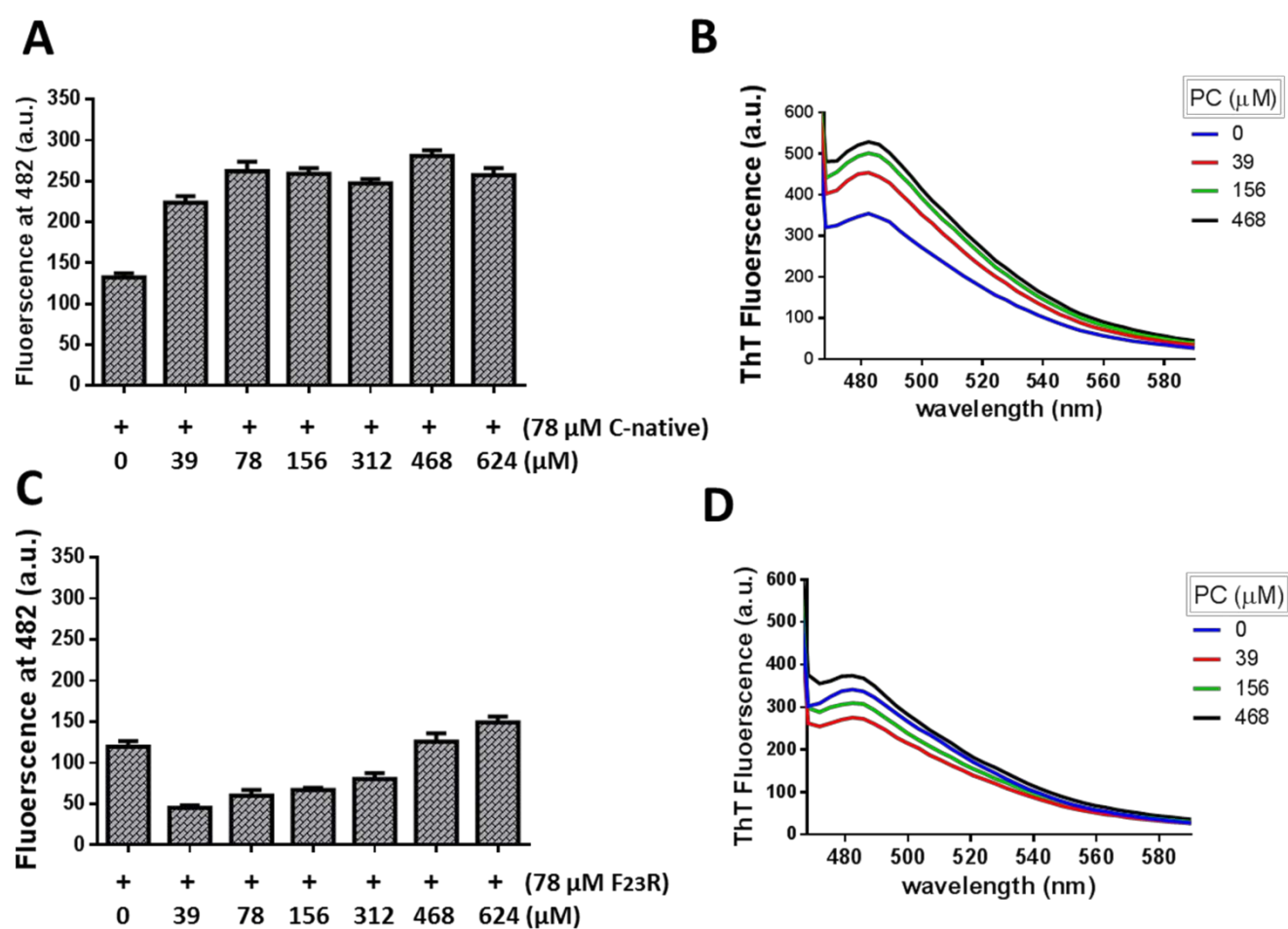


Fig 5.

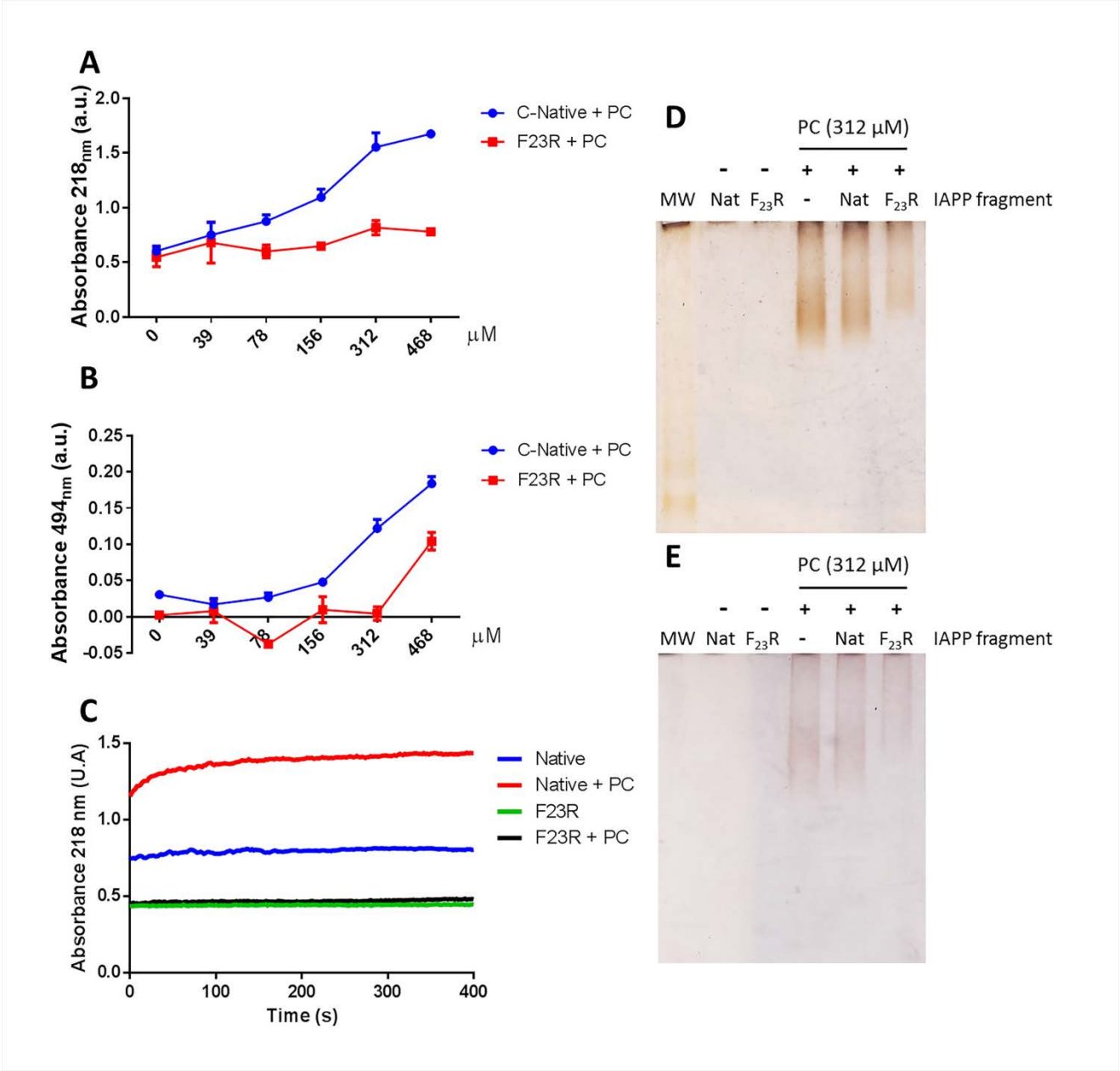


Fig 6.

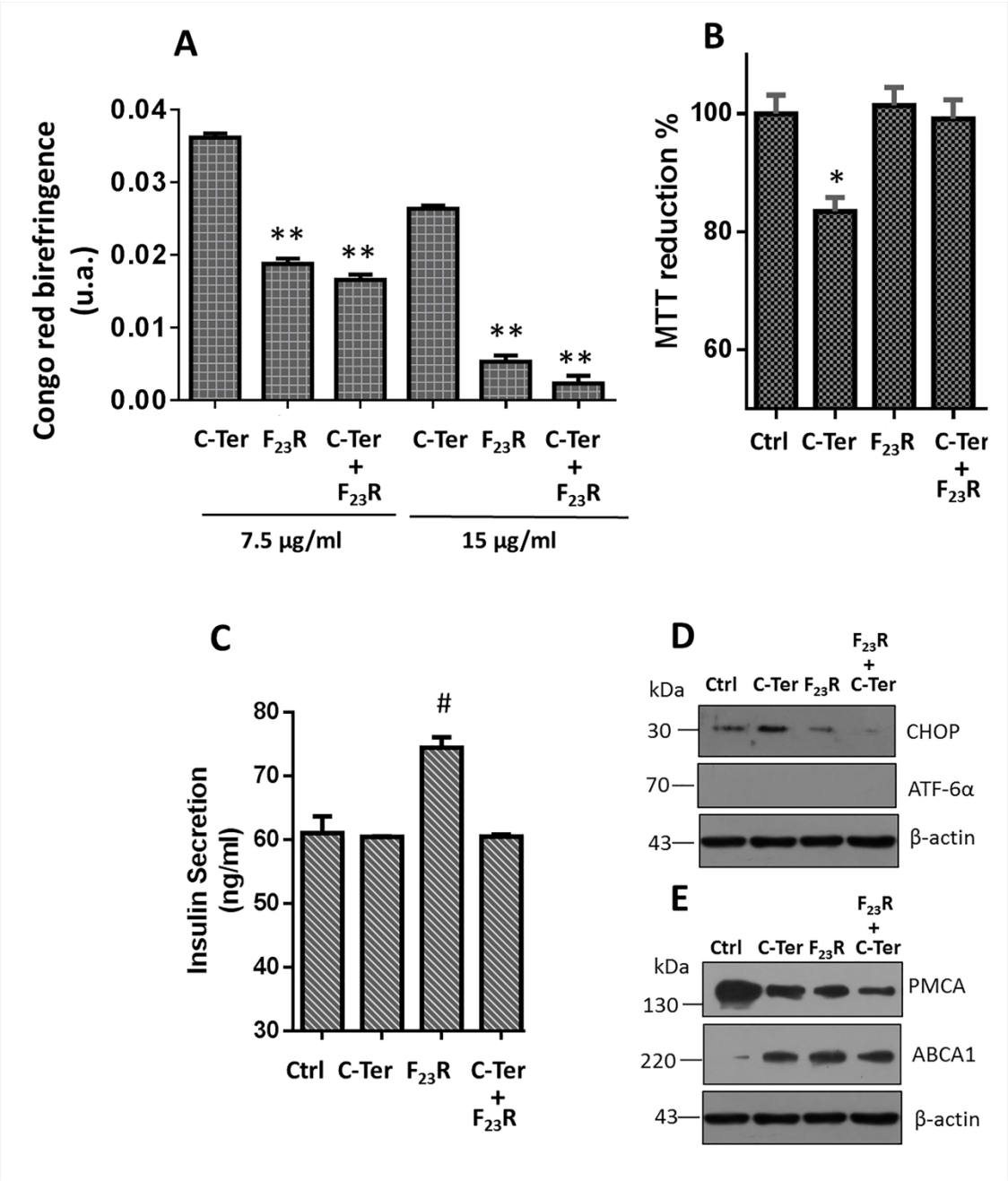


Fig 7.

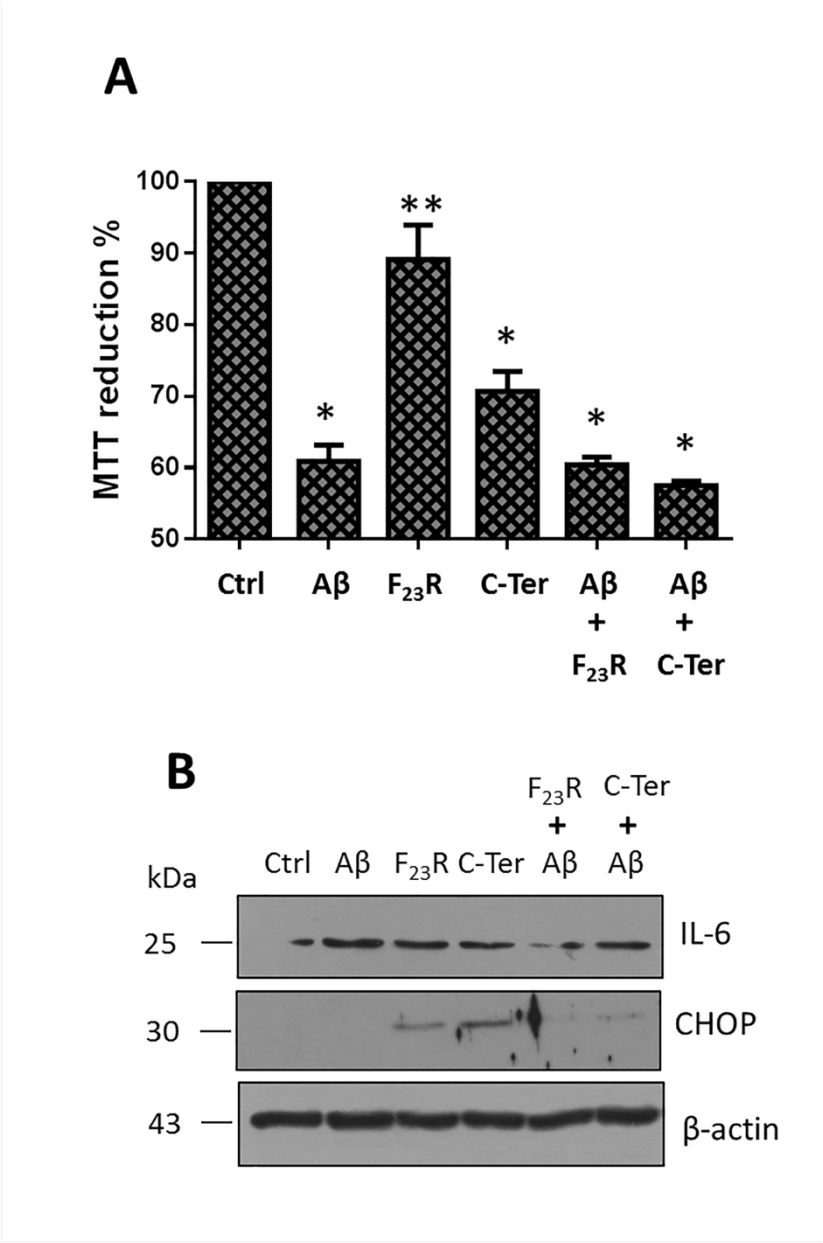
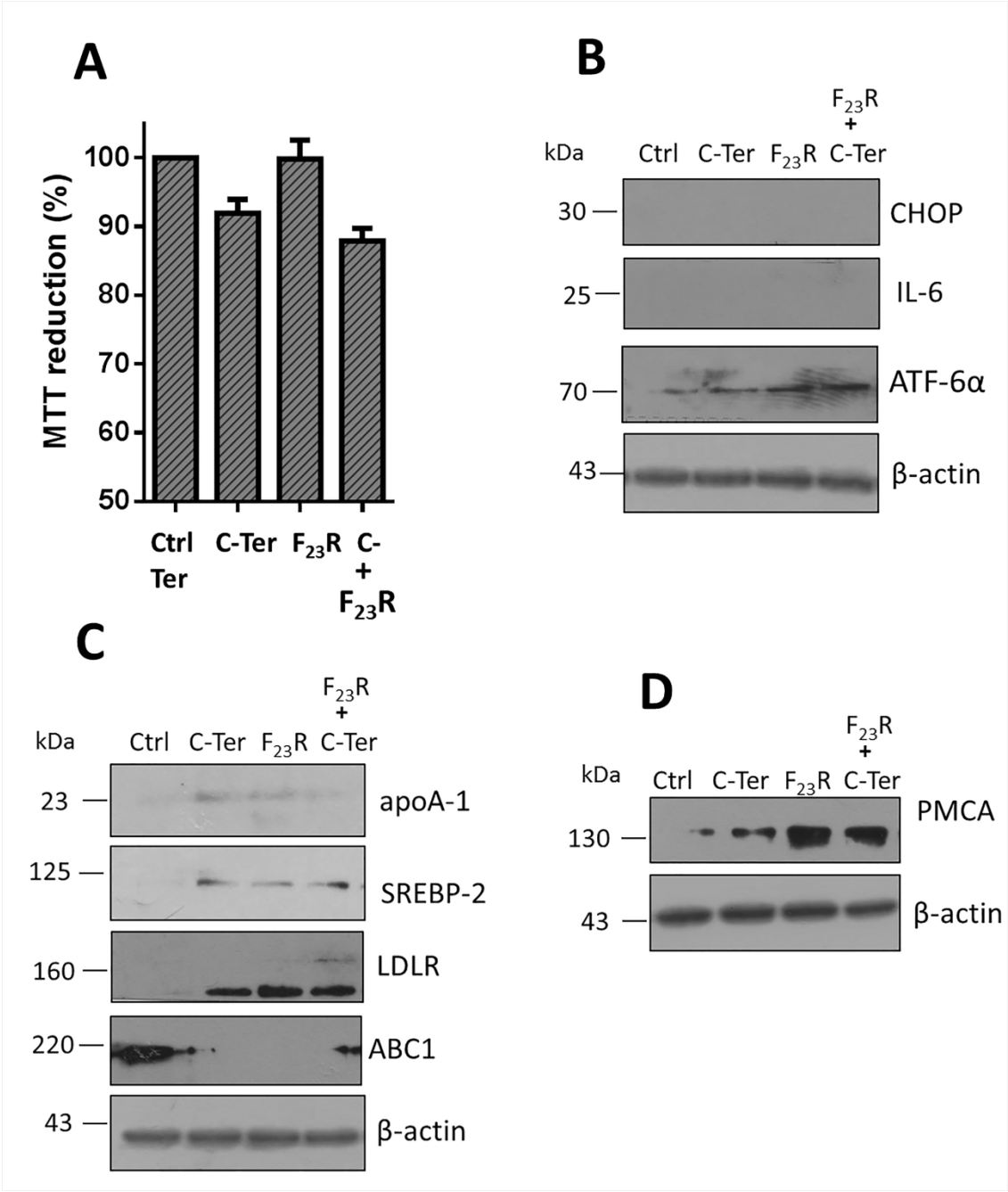


Fig 8.



Position	Amino acid	Variants	Residue variants	Total of sequences with the specific variants	Table 1. Primary structure of hIA PP placed in order position, showing the different variants that are originated from the comparison among 240 sequences, the frequency of each variant is shown.

1	K	K1R	K1E	K1I						3	10
2	C									0	0
3	N	N3G	N3D							2	15
4	T	T4I	T4M							2	6
5	A	A5V	A5I	A5P						3	7
6	T	T6I								1	1
7	C	C7Y								1	1
8	A	A8V	A8S	A8E	A8T					4	168
9	T	T9M	T9I							2	12
10	Q	Q10H								1	5
11	R	R11E	R11W	R11H						3	5
12	L									0	0
13	A	A13T	A13V	A13S						3	16
14	N	N14D	N14T	N14H						3	153
15	F	F15Y								1	1
16	L									0	0
17	V	V17D	V17G	V17T	V17A	V17I	V17S			6	34
18	H	H18R								1	209
19	S	S19T	S19F	S19A						3	4
20	S	S20G	S20N	S20C	S20R					4	28
21	N	N21S	N21G	N21H						3	43
22	N	N22S	N22T	N22I	N22K	N22G				5	66
23	F	F23I	F23L	F23M	F23R	F23A	F23V	F23G		7	206
24	G	G24R	G24A	G24S						3	4
25	A	A25T	A25D	A25P	A25V	A25S	A25I			6	52
26	I	I26V	I26A	I26L	I26M	I26Y				5	74
27	L	L27Y	L27I	L27F	L27S	L27H	L27X			6	166
28	S	S28V	S28A	S28L	S28P	S28T				5	53
29	S	S29P	S29A	S29T	S29H	S29L				5	211
30	T	T30V	T30P	T30R	T30N					4	5
31	N	N31K	N31D	N31S	N31V					4	32
32	V	V32M	V32L	V32G						3	10
33	G	G33S								1	1
34	S	S34A	S34P							2	4
35	N	N35S	N35A	N35T	N35Y	N35D	N35G	N35H	N35K	8	30
36	T	T36A	T36S							2	5
37	Y	Y37H								1	3

Table 2. Effect of substitutions of individual variants on human amylin sequence. In order, 15 sequences with lower aggregation and 15 with greater aggregation are showed, compared to hIAPP. *Hot spots* regions are identified in red

Variant	Sequence	Na4VSS	Hidroph.	PASTA	Organisms
V ₁₇ D	KCNTATCATQRLANFLD HSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-14.8	-0.31	-3.46	<i>S. crofa</i>
F ₂₃ R	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNRGAILSSSTNVGSNTY	-13.6	-0.30	-3.88	<i>C. auratus</i>
L ₂₇ H	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGA I HSSSTNVGSNTY	-12.1	-0.29	-4.10	<i>L. chalumnae</i>
F ₂₃ G	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNGGAILSSSTNVGSNTY	-11.7	-0.18	-3.88	<i>P. cristatus</i>
V ₃₂ G	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTN GGSNTY	-11.3	-0.22	-4.21	<i>P. cristatus</i>
V ₁₇ G	KCNTATCATQRLANFLG HSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-11.3	-0.22	-3.46	<i>A. nancymae</i> , <i>B. regulorum</i> , <i>S. boliviensis</i>
I ₂₆ A	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGA LSSSTNVGSNTY	-10.6	-0.17	-3.88	<i>C. cristata</i> , <i>C. porcellus</i> , <i>F. damarensis</i>
A ₂₅ D	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGD I LSSSTNVGSNTY	-10.4	-0.24	-3.95	<i>C. cristata</i>
F ₂₃ A	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNAGAILSSSTNVGSNTY	-10.4	-0.12	-3.88	<i>G. fortis</i> , <i>Z. albicollis</i> ,
V ₁₇ T	KCNTATCATQRLANFLT HSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-10.3	-0.23	-3.46	<i>C. harengus</i> , <i>E. lucius</i> , <i>S. araneus</i>
L ₂₇ S	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGA I VSSSTNVGSNTY	-10.1	-0.22	-6.19	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>C. cristata</i> , <i>P. cristatus</i>
V ₁₇ A	KCNTATCATQRLANFLA HSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-10.0	-0.16	-3.46	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>B. taurus</i> , <i>B. bubalis</i>
A ₈ E	KCNTATCETQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-9.3	-0.24	-4.94	<i>B. bison</i> , <i>B. mutus</i> , <i>B. taurus</i>
Y ₃₇ H	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNT H	-9.1	-0.15	-4.94	<i>C. hircus</i> , <i>O. aries</i>
T ₃₆ S	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSN S Y	-9.1	-0.10	-4.94	<i>O. princeps</i> , <i>O. cuniculus</i>
<i>H. sapiens</i>	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-5.6	-0.10	-4.94	
K ₁ I	ICNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-1.1	0.13	-4.94	<i>P. hamadryas</i> ,
S ₂₉ L	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILS L TNVGSNTY	-1.0	0.03	-6.36	<i>P. alecto lq</i>
S ₂₈ L	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAIL L STNVGSNTY	-1.0	0.03	-6.36	<i>C. porcellus</i> , <i>F. damarensis</i> , <i>H. glaber</i>
T ₃₀ V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSS V NVGSNTY	-0.8	0.04	-6.86	<i>O. princeps</i>
S ₂₈ V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAIL V STNVGSNTY	-0.5	0.04	-7.61	<i>A. limnaeus</i> , <i>C. variegatus</i> , <i>F. heteroclitus</i>
A ₂₅ I	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFG I LSSSTNVGSNTY	-0.5	-0.02	-7.41	<i>P. cristatus</i>
A ₅ I	KCNT I TCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-0.5	-0.02	-4.94	<i>O. princeps</i>
T ₉ I	KCNTA TCA I QRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-0.2	0.04	-4.94	<i>C. cristata</i> , <i>F. damarensis</i> , <i>H. glaber</i>
T ₆ I	KCNTA I CATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	-0.2	0.04	-4.94	<i>A. nancymae</i>
S ₁₉ F	KCNTATCATQRLANFLV H F SNNFGAILSSSTNVGSNTY	0.0	0.00	-6.50	<i>C. cristata</i>
R ₁₁ W	KCNTATCATQ W LANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	0.6	0.00	-5.84	<i>P. alecto lq</i>
T ₄ I	KCN I ATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY	0.9	0.04	-4.94	<i>A. nancymae</i>
N ₃₅ Y	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNV G S YTY	1.1	-0.04	-4.94	<i>L. chalumnae</i> , <i>P. gutturalis</i>
N ₃₁ V	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSS T VGSNTY	2.3	0.11	-6.97	<i>P. cristatus</i>
N ₂₂ I	KCNTATCATQRLANFLVHSS N I FGAILSSSTNVGSNTY	2.9	0.12	-3.46	<i>P. cristatus</i>

Anexo 5 Participación en otros trabajos

**MOLECULAR
PHARMACOLOGY**

Victor García González (Author) Queue Summary Reviewer Area Submit Submission History Help FAQ Feedback Log Out

Under Review - Check Status

The manuscript below has entered the review process. Click on the links below the manuscript metadata to perform actions.

MOLPHARM/2018/112078

Novel Mechanisms of Regulation of Meta-inflammation Phenomenon through PERK arm of Unfolded Protein Response

Octavio Galindo-Henández, Iván Córdova-Guerrero, Laura Janeth Díaz-Rubio, José Fernando Díaz-Villanueva, César Yahel Castañeda-Sánchez, Nicolás Serafin-Higuera, Angel Pulido-Capiz, and Victor García-González

Status: New

Date Received: 6 Feb 2018

Article Type: Article

Corresponding Author: Victor García-González

Keywords: Cholesterol; Fatty acid metabolism; Hepatocytes; Lipid signaling; Lipopolysaccharide (LPS); Macrophages

Supplemental Files: 1

[\[Withdraw Paper\]](#) [\[PDF version of your paper\]](#) [\[HTML References\]](#) [\[Download Supplemental Files\]](#) [\[Upload signed copyright form\]](#)

Novel Mechanisms of Regulation of Meta-inflammation Phenomenon through PERK arm of Unfolded Protein Response

Galindo-Hernández O¹, Córdova-Guerrero I², Díaz-Rubio LJ², Díaz-Villanueva JF¹, Castañeda-Sánchez CY¹, Serafin-Higuera N³, Pulido-Capiz A¹, and García-González V^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California 21000. México

² Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Clz. Universidad 14418, Parque Industrial Internacional, Tijuana, B.C. CP 22390, México

³ Facultad de Odontología Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California 21000. México

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

Abstract

Endoplasmic reticulum stress is a cellular condition that has been associated with metabolic disorders, contributing to the development of conditions such as obesity, fatty liver disease, and dyslipidemias. Within the physiology of cells with a high protein-secretory activity, such as hepatocytes and beta cells, the unfolded protein response (UPR) represents a critical mechanism under metabolic overload conditions which is turned on, in order to maintain protein homeostasis (proteostasis). UPR integrated by a tripartite signaling system, through ATF6 α , PERK and IRE1 arms, regulates transcription and translation of genes in charge to resolve stress and conserve proteostasis. Employing a hepatocyte model under metabolic overload by saturated palmitic and stearic fatty acids, the activation of PERK signaling through CHOP transcription factor was associated with COX-2 expression. Importantly, exosome-derived of macrophages can also induce meta-inflammation phenomenon, associated with a rearrangement in cholesterol metabolism and CHOP activation. We demonstrated for the first time, the cellular effect of terpene derived-molecules such as cryptotanshinone (Cry) purified of plant *Salvia brandegeei*, regulating meta-inflammatory conditions through PERK pathway; our data suggest the presence of a modulatory mechanism on protein translation process. This effect could be mediated by eukaryotic initiation factor-4A (eIF4A), evaluating salubrinal as a control

molecule, which targets eIF2 α dephosphorylation process. In addition, the protective mechanisms of unsaturated fatty acids, such as oleic and palmitoleic acid, was confirmed. Results obtained with Cry characterization indicate a possible new target through modulation of PERK signaling in cells with a high secretory activity.

Key words: meta-inflammation, CHOP transcription factor, proteostasis, unfolded protein response