

Ablation of Kex2 activity enhances proIAPP proteotoxicity in yeast

Ablação da atividade da Kex2 aumenta a proteotoxicidade induzida pelo proIAPP na levedura

Sofia Ferreira^{1,2}, Ana F. Raimundo^{3,4,5}, Inês Farrim^{1,2}, Regina Menezes^{1,3,4*}

¹CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; ²Universidad de Alcalá, Escuela de Doctorado, Departamento de Ciencias Biomédicas, Madrid, Spain; ³iBET - Instituto de Biología Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal; ⁴NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas, NMS|FCM, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal; ⁵ITQB-NOVA, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade NOVA Lisboa, Oeiras, Portugal

corresponding author / autor para correspondência: regina.menezes@ulusofona.pt

Abstract

Pancreatic deposition of Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP) is a histopathological hallmark of type 2 diabetes. Inadequate processing of immature IAPP by proprotein convertases (PCs) leads to the accumulation of unprocessed forms, which in turn favors increased aggregate formation in pancreatic β -cells. Kexin 2 (Kex2) of *Saccharomyces cerevisiae* is the prototype of eukaryotic PCs family, but to date no direct correlations between Kex2 activity and preproIAPP processing in yeast have been reported. In this study we aimed to address the possible role of Kex2 on IAPP maturation as a tool to investigate the contribution of impaired processing towards IAPP proteotoxicity. Genetically modified *S. cerevisiae* models lacking the *KEX2* gene and carrying different chimeric fusions of human IAPP linked to GFP were used. The cytotoxic effects of Kex2 ablation were assessed by means of growth curve analysis and cell viability assays using flow cytometry. IAPP protein profile was evaluated by immunoblotting assays using an anti-IAPP antibody. Intracellular IAPP aggregates were monitored by confocal fluorescence microscopy. Data showed that *kex2* mutants exhibit growth defects, potentiated by preproIAPP-GFP, proIAPP-GFP and mature IAPP-GFP expression with an increased cytotoxicity for proIAPP-GFP. Notwithstanding, Kex2 absence does not seem to affect IAPP protein pattern nor the frequency/distribution of intracellular IAPP aggregates in yeast. Our findings suggest that Kex2 is not essential for IAPP processing in yeast, at least under the conditions tested.

Keywords: Amylin, Islet Amyloid Polypeptide (IAPP), Kexin 2, Prohormone processing, *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

A deposição pancreática do Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP) é uma marca histopatológica da diabetes tipo 2. O processamento inadequado de IAPP imaturo pelas proproteínas convertases (PCs) despoleta a acumulação de formas não processadas que favorecem o aumento da formação de agregados nas células β . A Kexina 2 (Kex2) de *Saccharomyces cerevisiae* é o protótipo da família das PCs eucarióticas. Contudo, até ao momento, não existem evidências da ação da Kex2 no processamento do preproIAPP, em levedura. Neste estudo, pretendemos abordar o possível papel da Kex2 na maturação do IAPP como uma ferramenta para investigar a contribuição do processamento aberrante na proteotoxicidade deste péptido amiloidogénico. Foram utilizados modelos de *S. cerevisiae* que expressam diferentes fusões quiméricas de IAPP humano e nas quais o gene *KEX2* foi geneticamente deletado. Os efeitos citotóxicos da ablação da Kex2 foram avaliados através da análise de curvas de crescimento e ensaios de viabilidade celular por citometria de fluxo. O perfil de bandas do IAPP foi avaliado por ensaios de imunotransferência usando um anticorpo anti-IAPP. Agregados intracelulares de IAPP foram avaliados por microscopia confocal de fluorescência. Os dados mostraram que os mutantes *kex2* exibem defeitos de crescimento, potenciados pela expressão do preproIAPP-GFP, proIAPP-GFP e IAPP-GFP, havendo uma citotoxicidade aumentada para o proIAPP-GFP. No entanto, a ausência da Kex2 não parece afetar o padrão da proteína IAPP nem a frequência/distribuição dos seus agregados intracelulares em levedura. Estes resultados sugerem que a Kex2 não é essencial para o processamento do IAPP em levedura, pelo menos nas condições testadas.

Palavras-chave: Amilina, Polipéptido, Amilóide dos Ilhéus (IAPP), Kexina 2, Processamento de pro-hormonas, *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

Protein misfolding diseases cover a heterogeneous group of pathologies in which an amyloid-forming peptide acquires an alternative folding state, starts to oligomerize and to accumulate in tissues where the disease-specific damage occurs. This process can occur systemically or at the site of protein production, as it is the case of type 2 diabetes (T2D) (1). The uncontrolled deposition of Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP) is a hallmark of T2D, being present in nearly 90% of the individuals at post-mortem (2) and in 50% of insulinomas (3). IAPP, or amylin, is a 37-amino acid peptide which has regulatory functions in metabolism and glucose homeostasis. It acts on muscle cells and fat tissue by stimulating the uptake of glucose and by slowing gastric emptying through signaling in the Central Nervous System (4). Concerning its synthesis, IAPP is expressed and processed concomitantly with insulin in pancreatic β -cells. The initial and immature form of IAPP (preproIAPP, ppIAPP) is comprised of a sequence of 89 amino acid residues with a signal peptide. The signal peptide of ppIAPP is removed throughout its transfer to the endoplasmic reticulum (ER), originating a proIAPP (pIAPP) molecule that matures in the late Golgi complex into IAPP through the cleavage of two flanking peptides by protein convertase (PC)1/3, PC2 and carboxypeptidase E. Amidation of the C-terminal end and the formation of a disulfide bridge also occur, contributing to the yield of an active IAPP hormone (5). Mature IAPP is then stored in tight ratios with insulin in secretory granules, being released upon glucose stimulation (6,7). Yet, when there is a high demand for insulin, β -cells are required to perform with high turnover and may lose the capacity to properly process all the insulin and IAPP. Consequently, immature IAPP forms arise in the islets of individuals with diabetes, which are seen as even more amyloidogenic than its mature form (8). In human IAPP transgenic mice, immunoelectron microscopy revealed the presence of fibrillar aggregates immunoreactive for pIAPP-specific sera in the secretory granules of β -cells (8). In addition, amyloid composed of proIAPP was observed in cells lacking both PCs. Such evidence was not documented in cell models carrying functional PC2 and PC1/3 where efficient processing occurred (9). Corroborating the relevance of aberrant processing

Introdução

As doenças de dobramento incorreto de proteínas abrangem um grupo heterogêneo de patologias nas quais um péptido amiloidogénico adquire uma estrutura tridimensional alternativa, oligomeriza e se acumula nos tecidos onde ocorre o dano específico da doença. Esse processo pode ocorrer sistemicamente ou no local da produção da proteína, como é o caso da diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (1). A deposição descontrolada do Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP) é uma característica histopatológica da DM2, estando presente em quase 90% dos indivíduos após a sua morte (2) e em 50% dos insulinomas (3). O IAPP, ou amilina, é uma hormona de 37 aminoácidos que atua na regulação do metabolismo e na homeostasia da glucose. Atua nas células do músculo e no tecido adiposo estimulando a captação de glucose e retardando o esvaziamento gástrico através da sinalização no Sistema Nervoso Central (4). Relativamente à sua síntese, o IAPP é expresso e processado concomitantemente com a insulina nas células β pancreáticas. A forma inicial e imatura do IAPP (preproIAPP, ppIAPP) compreende uma sequência de 89 resíduos de aminoácidos com um péptido sinal. Ao longo do seu transporte para o retículo endoplasmático (RE), o péptido sinal é clivado, originando uma molécula de proIAPP (pIAPP) que é processada no complexo de Golgi tardio através da clivagem das regiões flanqueadoras pelas proteína convertases (PC) 1/3, PC 2 e carboxipeptidase E. Nesta etapa, ocorre também a amidação da extremidade C-terminal e a formação de uma ponte de dissulfeto, o que contribui para a produção de uma hormona de IAPP madura e ativa (5). O IAPP maduro é então armazenado juntamente com a insulina nos grânulos secretórios, sendo libertado após a estimulação da glucose (6,7). No entanto, quando existe uma alta demanda por insulina, as células β são obrigadas a funcionar com alta rotatividade e podem perder a capacidade de processar adequadamente toda a insulina e o IAPP. Consequentemente, formas de IAPP imaturas altamente amiloidogénicas surgem nas ilhas pancreáticas de indivíduos com diabetes (8). Experiências de microscopia imunoeletrónica, em ratinhos transgênicos para IAPP humano, revelaram a presença de agregados fibrilares imunorreativos a soros de pIAPP nos grânulos secretores das células β (8). Além disso, em células onde ambas as PCs não se encontram presentes, observou-se deposição de agregados de proIAPP. Tal evidência não foi documentada em modelos celulares contendo a PC2 e a PC1/3 completamente funcionais (9). Corroborando a relevância do processamento aberrante na acumulação de intermediários de IAPP imaturos e no progresso da

in the accumulation of immature IAPP intermediates and disease progress, the ratio of serum pIAPP/IAPP levels was found to be altered in individuals with T2D displaying impaired glucose regulation (10). Accumulation of IAPP intermediate species favors to the formation of oligomers that can act as trigger agents for β -cell depletion (4). These IAPP oligomers are thought to be involved in multiple toxic mechanisms. They have been described to disrupt cellular membrane dynamics (11-12), inhibit cell proliferation, impair autophagy (13), dysregulate calcium homeostasis (14) and induce overproduction of reactive oxygen species (4,15-16). Augmented concentrations of pIAPP in the ER have been reported to activate the unfolded protein response (UPR) and other ER stress pathways which, if not checked, can culminate in cell apoptosis (17-18). Despite that, the role of these incompletely processed forms within the plethora of cytotoxic effects attributed to IAPP is not yet fully understood.

Recently, we described a *Saccharomyces cerevisiae* model expressing differently processed forms of IAPP fused to Green Fluorescent Protein (GFP) (19). These models recapitulated the major molecular pathways related to IAPP aggregation, thus representing an unprecedented tool to study the molecular mechanisms affected by IAPP proteotoxicity. The same study showed that ppIAPP-GFP is at least partially processed towards its mature form, which implies the action of a protein convertase equivalent to PC1/3 and PC2 in β -cells. In that view, Kexin 2 (Kex2), appears as the most probable candidate to perform such processing. Kex2 has been described as a prohormone-processing protease that catalyzes the cleavage of peptides both in Lys-Arg and Arg-Arg motifs, in a Ca^{2+} -dependent manner (20). Selectively located to the late compartment of the Golgi complex in yeast, it contains a single transmembrane domain and a retention signal on C-terminal cytosolic tail sequence. Consistent with this compartmentalization, Kex2 has emerged as a protease that acts on a strict spectrum of target proteins in the late compartments of secretory pathway (e.g. precursors of prohormones, neuropeptides and integral membrane proteins) (21). Further supporting a possible role of Kex2 in IAPP processing, this convertase was shown to cleave the insulin precursor protein in the late secretory pathway of yeast (22). This is particularly interesting when considering that IAPP and insulin are co-processed by the same protein convertases in pancreatic β -cells (23).

doença, níveis alterados de pIAPP/IAPP no soro foram detetados em indivíduos com diabetes do tipo 2 e com um quadro de resposta deficiente ao estímulo de glucose (10). A acumulação de espécies intermediárias de IAPP favorece a formação de oligómeros que podem atuar como agentes desencadeadores da depleção das células β (4). Acredita-se que estes oligómeros de IAPP estejam envolvidos em vários mecanismos tóxicos, nomeadamente na disrupção estrutural da membrana celular (11-12), inibição da proliferação celular, desregulação da homeostasia do cálcio (14) e produção de espécies reativas de oxigénio (4,15-16). Foi relatado que concentrações aumentadas de pIAPP no RE ativam a *unfolded protein response* (UPR) e outras vias de stress do RE que, se não forem devidamente controladas, podem culminar na apoptose das células (17-18). Apesar destas evidências, o envolvimento destas formas não processadas nos efeitos citotóxicos atribuídos ao IAPP ainda não é totalmente compreendido.

Recentemente, descrevemos um modelo de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de expressar diferentes formas processadas de IAPP, fundidas à Proteína Verde Fluorescente (GFP) (19). Estes modelos recapitularam as principais vias moleculares relacionadas à agregação do IAPP, representando uma ferramenta robusta para estudar os mecanismos moleculares afetados pela toxicidade deste péptido amiloidogénico. O mesmo estudo mostrou que o preproIAPP-GFP é parcialmente processado até adquirir a sua forma madura, o que implica a ação de uma proteína convertase equivalente à PC 1/3 e PC2 nas células β . Neste sentido, a Kexina 2 (Kex2) aparece como a candidata mais provável para realizar tal processamento. A Kex2 foi descrita como sendo uma protease envolvida no processamento de pro-hormonas, que catalisa a clivagem de péptidos nos motivos Lys-Arg e Arg-Arg, num processo dependente de Ca^{2+} (20). Seletivamente localizada no compartimento tardio do complexo de Golgi, em levedura, a Kex2 contém um único domínio transmembranar e um sinal de retenção na sequência da sua cauda citosólica C-terminal. De acordo com esta compartimentalização, a Kex2 tem sido descrita como uma protease que atua num espectro estrito de proteínas alvo nos compartimentos tardios da via secretória (por exemplo, precursores de pro-hormonas, neuropéptidos e proteínas integrais de membrana) (21). Apoiando um possível papel da Kex2 no processamento do IAPP, esta convertase demonstrou ser capaz de clivar a proteína precursora da insulina na via secretória tardia (22). Tal dado é particularmente interessante uma vez que o IAPP e a insulina são coprocessados pelas mesmas proteínas convertases nas células β pancreáticas (23).

Although some proteins have been predicted as potential targets of Kex2, the number of substrates for which there is experimental evidence of cleavage by Kex2 remains scarce (24). In the scope of IAPP processing events, the substrate specificity of *Saccharomyces cerevisiae* Kex2 protease has great importance. Kex2 is considered the prototype for the family of eukaryotic subtilisin-like serine proprotein convertases that comprises the human PC1/3, PC2 and furin (25). Specifically, in regard to IAPP, no direct correlations between Kex2 activity and the processing of such amyloidogenic peptide have been reported to date. To fill this gap of knowledge, we used genetically modified *S. cerevisiae* models expressing different forms of human IAPP to investigate the possible involvement of Kex2 on IAPP enzymatic processing. By sharing conserved cellular and molecular mechanisms with human cells, yeast represents a versatile and powerful experimental model to study fundamental biological processes involved in human diseases (26). Thus, the use of yeast models to dissect Kex2 proteolytic action on IAPP may represent an important tool to elucidate the mechanisms underlying aberrant IAPP processing and consequent accumulation of immature species observed in disease scenarios.

Materials and methods

Strains and plasmids

The strain BY4741 *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* and the isogenic *kex2* mutant strain (EUROSCARF) were used. Both strains were transformed with different chimeric fusions of IAPP linked to GFP. Yeast transformation protocols were performed following the lithium acetate standard technique (27). The constructs used are indicated in Table 1.

Yeast growth conditions

Cells were maintained in synthetic dropout (SD)-glucose medium. Prior to experiments, an inoculum was made in SD-raffinose medium at 30°C for 24 h and under agitation. Cell cultures were diluted in new medium and incubated as indicated above until reaching an optical density of 0.5 ± 0.05 at 600 nm (OD_{600}). Measurements were acquired using a Biotek

Embora algumas proteínas tenham sido já descritas como potenciais alvos da Kex2, o número de substratos para os quais existe prova experimental de clivagem por parte desta protease permanece escasso (24). No que diz respeito ao processamento do IAPP, a especificidade do substrato da Kex2 é de extrema importância. A Kex2 de *Saccharomyces cerevisiae* é o protótipo da família das PCs eucarióticas encontradas em humanos, e que abrange a PC1/3, PC2 e a furina (25). Especificamente, no que diz respeito ao IAPP, nenhuma correlação direta entre a atividade da Kex2 e o processamento deste péptido amiloidogénico foi relatada até o momento. Para preencher esta lacuna de conhecimento, usámos modelos geneticamente modificados de *S. cerevisiae* capazes de expressar diferentes formas de IAPP humano a fim de investigar o possível envolvimento da Kex2 no processamento enzimático do IAPP. Partilhando mecanismos celulares e moleculares altamente conservados com as células humanas, a levedura representa um modelo experimental versátil para estudar os processos biológicos envolvidos em doenças humanas (26). Desta forma, o estudo da ação proteolítica da Kex2 no IAPP, em modelos de levedura, poderá representar uma ferramenta importante para elucidar os mecanismos subjacentes ao processamento aberrante do IAPP e consequente acumulação de espécies imaturas observada em cenários de doença.

Materiais e métodos

Estirpes de levedura e plasmídeos

A estirpe BY4741 *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* e a estirpe mutante isogénica *kex2* (EUROSCARF) foram usadas neste estudo. Ambas as estirpes foram transformadas com diferentes fusões quiméricas de IAPP ligadas a GFP. Os procedimentos de transformação das leveduras foram realizados conforme indicado no método de acetato de lítio (27). Os plasmídeos usados encontram-se listados na Tabela 1.

Condições de crescimento das culturas de levedura

As células foram mantidas em meio sintético com glucose. Antes de cada experiência, foi preparado um inóculo em meio sintético com rafinose a 30 °C, durante 24 h sob agitação orbital. As culturas de células foram diluídas em meio fresco e incubadas tal como acima indicado, até atingir uma densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) de 0.5 ± 0.05 . As leituras foram adquiridas usando o espectrofotómetro de microplacas Biotek

Table 1 - Plasmids used in this study.

Tabela 1 - Plasmídeos usados neste estudo.

Plasmid / Plasmídeo	Description / Descrição	Reference / Referência
p426*	<i>GAL1_{promoter}</i> , 2 μ , URA	ATCC 87341 ^{TM**}
p426-ppIAPP_GFP	<i>GAL1_{promoter}</i> , ppIAPP_GFP, 2 μ , URA	Raimundo et al, 2020
p426-pIAPP_GFP	<i>GAL1_{promoter}</i> , pIAPP_GFP, 2 μ , URA	Raimundo et al, 2020
p426-matIAPP_GFP	<i>GAL1_{promoter}</i> , matIAPP_GFP, 2 μ , URA	Raimundo et al, 2020

*Empty plasmid used as control / Plasmídeo vazio usado como controle

**American Type Culture Collection

Power Wave XS plate spectrophotometer (Winooski, VT, USA). Constructs expression was modulated by incubating the cells in SD medium with glucose (repression) or galactose (induction). Detailed protocols were previously described by our research group (19).

Flow cytometry

Cultures were diluted in SD-galactose to OD₆₀₀ 0.1 \pm 0.01 and maintained for 12 h at 30°C under orbital shaking. Flow cytometry was carried out using propidium iodide (PI) as previously described (19).

Protein extraction and Immunoblotting

Cultures were diluted in SD-galactose medium to OD₆₀₀ 0.1 \pm 0.01 and maintained at 30°C for 12 h under orbital shaking. Protein extraction and immunoblotting were performed as previously described (19) using the antibodies indicated in [Supplementary Table S1](#).

Growth Assays

For growth assays, yeast cells were diluted in SD-glucose or SD-galactose medium to OD₆₀₀ 0.05 \pm 0.005 and maintained at 30°C with agitation during 24 h. Yeast growth was checked hourly by reading OD₆₀₀ using a Biotek Power Wave XS Microplate Spectrophotometer.

Confocal microscopy

Cell cultures were diluted to OD₆₀₀ 0.1 \pm 0.01 in SD-galactose medium and incubated at 30°C for 12 h under orbital shaking. The culture was centrifuged at 3000 g for 3 min and resuspended in PBS. Slides were prepared using a mixture of 4 μ l of low melting point agarose and 4 μ l of cell suspension. GFP signal was monitored using a Carl Zeiss LSM 710 (Jena, Germany) for confocal microscopy or Leica Z2

Power Wave XS (Winooski, VT, EUA). A expressão do IAPP foi modulada através da incubação das células em meio sintético com glucose (repressão) ou com galactose (indução). O protocolo detalhado foi anteriormente descrito pelo nosso grupo (19).

Citometria de fluxo

As culturas celulares foram diluídas para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 \pm 0,01 em meio sintético com galactose e incubadas a 30°C por 12 h sob agitação orbital. A citometria de fluxo foi realizada usando iodeto de propídio (PI) tal como descrito anteriormente (19).

Extração de Proteínas e Imunotransferência

As culturas celulares foram diluídas para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 \pm 0,01 em meio sintético com galactose e incubadas a 30°C por 12 h sob agitação orbital. A extração de proteínas e a imunotransferência foram realizadas tal como anteriormente descrito (19) e usando os anticorpos indicados na [Tabela Suplementar S1](#).

Curvas de crescimento

Para as curvas de crescimento, as culturas foram diluídas para uma OD₆₀₀ igual 0,05 \pm 0,005 em meio sintético com glucose ou galactose, e foram incubadas a 30°C com agitação por 24 h. O crescimento foi monitorizado de hora a hora medindo a OD₆₀₀ com um espectrofotômetro de microplacas Biotek Power Wave XS.

Microscopia de fluorescência e confocal

As culturas celulares foram diluídas para uma OD₆₀₀ igual a 0,1 \pm 0,01 em meio sintético com galactose e incubadas a 30°C por 12 h sob agitação orbital. As células foram recolhidas por centrifugação a 3000 g por 3 min e ressuspendidas em PBS. As lâminas foram preparadas com 4 μ l de suspensão de células e misturadas com 4 μ l de agarose de baixo ponto de fusão. A fluorescência do

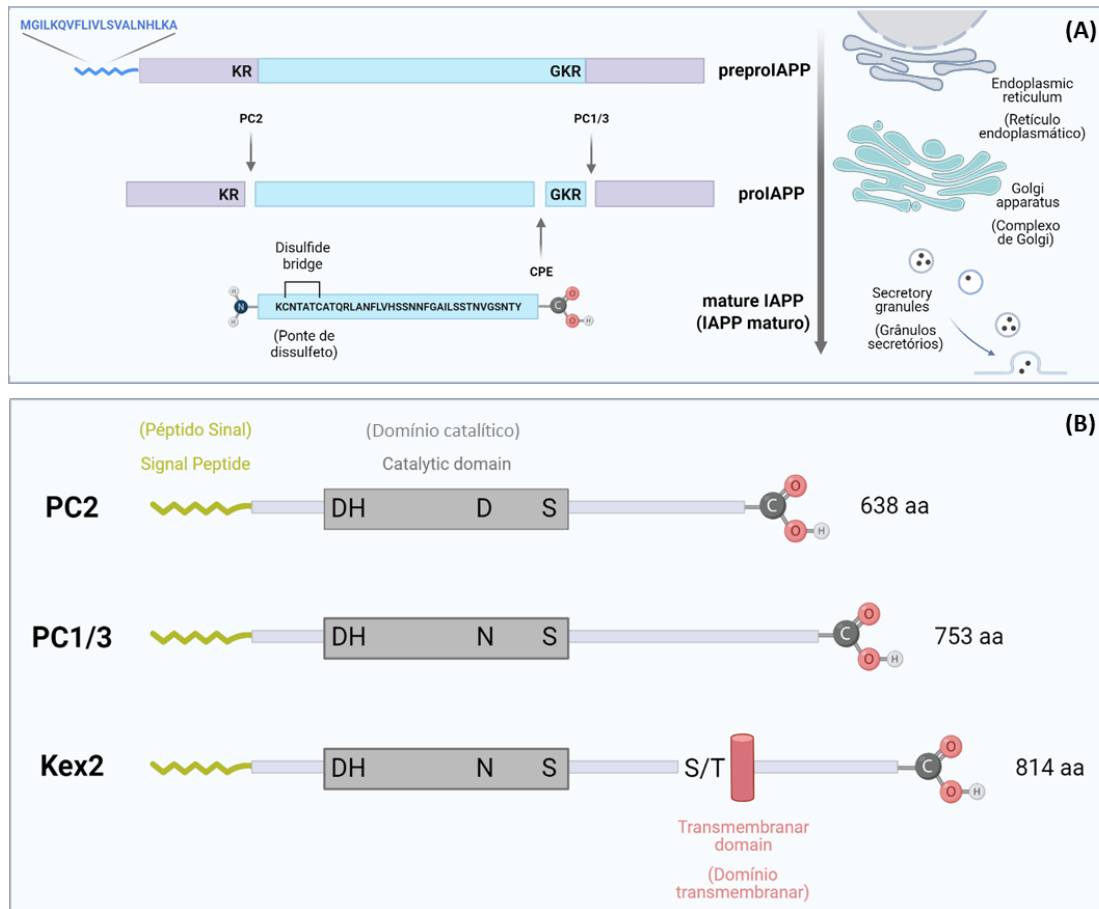


Figure 1 - Schematic representation of IAPP processing (A) and comparison of yeast and human prohormone convertases structural domains (B).

IAPP is synthesized as an 89-residue preprohormone that contains an endoplasmic reticulum signal peptide. In this organelle, this signal is cleaved originating a prohormone molecule. Once in late Golgi complex, N- and C-terminal flanking regions of proIAPP are excised by prohormone convertases (PC2 and PC1/3) and carboxypeptidase E. Amidation of the C-terminus and the formation of a disulfide bridge occur in a multistep process, leading to the formation of a mature IAPP molecule that is packaged and released in secretory granules. The processing enzymes of secretory pathway are related to subtilisin and to the yeast processing protease Kex2, and are known as subtilisin-like proprotein convertases (PCs). In mammals, few members of this family have been identified and characterized, as is the case of PC1/3 and PC2. Like subtilisin and kexin, the activation of these proteases occurs by autocatalytic cleavage of a N-terminal propeptide located between the signal peptide and the catalytic domain. The presence of a signal peptide, a prosegment, and a catalytic domain is shared by all convertases that display the characteristic catalytic triad residues Asp, His and Ser. In Kex2, the existence of a transmembrane domain is responsible for the retention of this protease in the late Golgi complex. The variable C-terminal regions of the PCs are less conserved and play a role in their subcellular routing. Schematic representation based on published data.

Figura 1 – Representação esquemática do processamento do IAPP (A) e comparação dos domínios estruturais das pro-hormona convertases humanas e de levedura (B).

O IAPP é sintetizado como uma preprohormona de 89 resíduos de aminoácidos contendo um péptido sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático. Neste organelo, o péptido sinal é clivado originando uma prohormona. Uma vez presente no complexo de Golgi, as regiões flaqueantes N- e C-terminal do proIAPP são excisadas pelas pro-hormona convertases (PC2 e PC1/3) e pela carboxipeptidase E. A amidação da região C-terminal e a formação da ponte de dissulfeto ocorrem posteriormente, levando à formação de uma molécula de IAPP madura que é empacotada nos grânulos secretórios. As enzimas de processamento da via secretória fazem parte de uma família de pro-proteínas convertases associadas à subtilisina. Alguns membros desta família foram identificados e caracterizados em mamíferos, como é o caso da PC1/3 e da PC2. À semelhança da subtilisina e da kexina, a ativação da PC1/3 e PC2 ocorre pela clivagem autocatalítica de um pro-péptido N-terminal localizado entre o péptido sinal e o domínio catalítico. A presença de um péptido sinal, de um pro-segmento e de um domínio catalítico é uma característica partilhada por todas as convertases que exibem os resíduos típicos da tríade catalítica Asp, His e Ser. Na Kex2, a existência de um domínio transmembranar é responsável pela retenção desta protease no complexo de Golgi. A região variável do C-terminal das PCs é menos conservada e desempenha um papel na sua localização subcelular. Representação esquemática baseada em dados publicados na literatura.

(Wetzlar, Germany) for fluorescence microscopy. The number of aggregates-containing cells was counted by visualizing at least 800 cells for each condition. Photos were counted using Fiji-ImageJ1.51j8 software (USA).

Statistical Analysis

GraphPad Prism 6 software was used to carry out the statistical analysis. Two-way ANOVA with the Tukey's multiple comparison test was used to access differences between conditions in the viability test. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison analysis was applied to test for differences between conditions in immunoblotting and microscopy analysis.

Results And Discussion

Kex2 as a possible prohormone convertase involved in ppIAPP processing

IAPP is the main element of amyloid inclusions in pancreatic islets of diabetic patients. Like insulin, IAPP is produced as a prepropeptide in the ER and processed to the mature and active form in secretory granules before its extracellular release. IAPP is formed by exclusion of both C- and N-terminal flanking peptides at basic amino acids pairs, through the action of prohormone convertases (PC2 and PC1/3) that recognize specific and highly conserved sites of cleavage in the peptide sequence (5) (Figure 1A). In *S. cerevisiae*, Kex2 (or Kexin) appears as the yeast homolog of such processing enzymes. Kex2 cleaves target peptides at paired dibasic sites, being essential to generate the final and active forms of excreted proteins such as killer toxin, α -factor, insulin and, eventually, IAPP (28). Kex2 is a membrane-attached protein that is originally targeted to the ER. Ultimately, it acts at the trans-Golgi network (TGN), circulating between trans-Golgi vesicles and the late endosomal compartments (29,30). Structurally, it contains an ER signal peptide in the N-terminus, followed by a catalytic domain that bears most of the similarities between PC2, PC3 and Kex2 residue sequences. Within the first 600 amino acids, 34-45% of the residues are identical between any pair of these proteins. Beyond the first 600 residues, near the end of PC2, Kex2 contains a hyperglycosylated

GFP foi visualizada usando um microscópio Carl Zeiss LSM 710 (Jena, Alemanha) para microscopia confocal ou Leica Z2 (Wetzlar, Alemanha) para microscopia de fluorescência. O número de células com agregados foi avaliado através da monitorização de pelo menos 800 células para cada condição. As imagens foram analisadas usando o software Fiji-ImageJ1.51j8 (EUA).

Análise Estatística

O software *Graphpad Prism 6* foi usado para fazer a análise estatística dos resultados. A análise ANOVA bilateral com o teste de comparação múltipla de Tukey foi realizada para avaliar as diferenças entre as condições no ensaio de viabilidade celular. A análise ANOVA bilateral com o teste de comparação múltipla de Sidak foi realizada para avaliar as diferenças entre as condições nos ensaios de imunotransferência e microscopia.

Resultados e Discussão

Kex2 como potencial pro-hormona convertase envolvida no processamento do ppIAPP

O IAPP é o principal elemento dos depósitos amilóides encontrados nas ilhas pancreáticas de doentes diabéticos. Tal como a insulina, o IAPP é produzido no RE na forma de uma preprohormona, sendo depois convertido à forma madura nos grânulos de secreção antes da sua libertação extracelular. O IAPP é formado pela remoção das regiões flanqueadoras C- e N-terminais através da ação das prohormona convertases PC2 e PC1/3 que reconhecem sítios de clivagem específicos e altamente conservados na sequência peptídica (5) (Figura 1A). Na *S. cerevisiae*, a Kex2 (ou kexina) aparece como sendo o homólogo destas enzimas de processamento. A Kex2 cliva os péptidos alvo em sítios dibásicos, sendo a sua ação necessária para produzir as formas finais e ativas das proteínas secretadas, como o caso da toxina *killer*, o fator alfa, a insulina e, eventualmente, o IAPP (28). A Kex2 é uma proteína membranar que é inicialmente direcionada para o RE e que depois, funciona na rede trans-Golgi (TGN), circulando entre as vesículas trans-Golgi e os compartimentos endossomais tardios (29-30). Estruturalmente, a Kex2 contém um péptido sinal de endereçamento para o RE na extremidade N-terminal, seguido por um domínio catalítico que possui a maioria das semelhanças entre as sequências de aminoácidos da PC2, PC3 e Kex2. Dentro dos primeiros 600 aminoácidos, 34-45% dos resíduos são idênticos entre qualquer par dessas proteínas. Além dos primeiros 600 resíduos, a Kex2 contém ainda

serine/threonine rich region and a single transmembrane domain that is important for its function and localization as an integral membrane protein (Figure 1B) (30,31).

Absence of Kex2 protease increases cytotoxicity of proIAPP-GFP in yeast

In diabetes, the increased need for insulin production caused by increased blood glucose levels is accompanied by an overproduction of IAPP which completely overloads and impairs the β -cell processing machinery. Abnormal post-translational processing of IAPP precursor peptide has been associated to the buildup of intermediate immature forms of IAPP and consequent deposition of cytotoxic intracellular oligomers (1,4,5).

To address the impact of Kex2 lack on IAPP processing, we generated genetically modified yeast models that do not harbor the *KEX2* gene (*kex2* strain) and simultaneously express different chimeric constructs of human IAPP (p426-ppIAPP-GFP (ppIAPP-GFP), p426-pIAPP-GFP (pIAPP-GFP) and p426-matIAPP-GFP (matIAPP-GFP)) (19). In these constructs, each cDNA was cloned in fusion with GFP and under the regulation of a promoter inducible by galactose (*GALI*). For comparison, the isogenic strain BY4741 was used as a control encoding a functional processing machinery. These models were previously described and characterized, showing that expression and aggregation of immature ppIAPP species causes a marked cellular toxicity (19). The expression of IAPP constructs in the null-mutant strain was confirmed by the presence of GFP positive cells as checked by flow cytometry analysis ([Supplementary Figure S1](#)). Cell viability was next evaluated upon 12 h galactose induction of IAPP expression, through PI staining by flow cytometry. PI is membrane-impermeant and excluded from viable cells. It can only cross compromised cellular membranes, being therefore considered an indicator of membrane integrity (33). According to our previous data, at this timepoint only ppIAPP-GFP expression significantly reduced the cell viability in BY4741 cells, with other constructs showing lower levels of toxicity (19). Interestingly, genetic ablation of *KEX2* gene significantly increased pIAPP-GFP cytotoxicity, while no effects were observed in strains expressing the

uma região rica em serina/treonina hiperglicosilada e um único domínio transmembranar que é importante para a sua função e localização enquanto proteína de membrana integral (Figura 1B) (30-31).

A ausência da protease Kex2 aumenta a citotoxicidade do proIAPP-GFP em levedura

Na diabetes, a necessidade aumentada para a produção de insulina induzida por uma condição de hiperglicemia é acompanhada por uma produção exacerbada de IAPP que sobrecarrega a maquinaria de processamento das células β pancreáticas. Anomalias ao nível do processamento pós-traducional do péptido precursor do IAPP tem sido associado à acumulação de formas imaturas intermediárias de IAPP e consequente formação de oligómeros intracelulares tóxicos (1,4,5).

Para estudar o impacto da ausência da Kex2 no processamento do IAPP, desenvolvemos modelos de levedura geneticamente modificados que não possuem o gene *KEX2* (estirpe mutante *kex2*) e que expressam simultaneamente diferentes construções quiméricas de IAPP humano (p426-ppIAPP-GFP (ppIAPP-GFP), p426-pIAPP-GFP (pIAPP-GFP) e p426-matIAPP-GFP (matIAPP-GFP)) (19). Nestas construções, os respetivos cDNAs foram clonados em fusão com o GFP e sob a regulação do promotor induzido pela galactose (*GALI*). Para comparação, a estirpe isogénica BY4741 foi usada como controlo, uma vez que possui uma maquinaria de processamento totalmente funcional. Estes modelos foram previamente descritos e caracterizados, tendo mostrado que a expressão e agregação de espécies imaturas de ppIAPP causam uma marcada toxicidade celular (19). A expressão de fusões quiméricas de IAPP no mutante nulo foi confirmada pela presença de células que expressam GFP conforme verificado por citometria de fluxo ([Figura Suplementar S1](#)). Posteriormente, a viabilidade celular foi avaliada após 12 h de indução da expressão de IAPP com galactose, através de marcação com iodeto de propídio (PI) seguida de citometria de fluxo. Em condições normais, o PI não tem capacidade de penetrar a membrana celular, sendo excluído das células viáveis. Este composto apenas consegue atravessar membranas celulares comprometidas, sendo, portanto, considerado um indicador da integridade membranar (33). De modo consistente com dados anteriormente obtidos pelo nosso grupo, às 12 h de indução, apenas a expressão do ppIAPP-GFP reduziu significativamente a viabilidade celular em células BY4741, com as outras construções mostrando níveis de toxicidade mais baixos (19). Curiosamente, a ablação genética do gene *KEX2* aumentou significativamente a citotoxicidade do

other constructs. In mutant ppIAPP-expressing cells, PI levels remained unchanged suggesting that the absence of Kex2 protease *per se* is not sufficient to further exacerbate the toxicity of the most immature IAPP form (Figure 2). A plausible explanation is that signal peptide-mediated ppIAPP-GFP addressing to ER may exacerbate accumulation of immature forms and clog the secretory pathway creating a problem upstream to the cleavage by protein convertases.

The cellular membrane of yeast is known to be involved in major biological processes, serving as a barrier to solute(s) diffusion, stores energy as transmembrane ions and solute gradients, offers sites of enzyme pathways engaged in the synthesis of cell components, among others. These functions are crucial to maintain the intracellular homeostasis and gather the elements required for cell growth and division (34). Since PI analysis showed alterations in membrane integrity in certain conditions (Figure 2), we decided to address how the expression of different IAPP constructs impacts the growth of Kex2-lacking yeast. Growth curve analyses were performed for wild type and mutant strains (Figure 3A). Cultures of BY4741 expressing the differently processed IAPP species showed an initial lag phase that is well-matched with the change in the carbon source from raffinose to galactose. Subsequently, these strains resumed growth and behave similarly, with ppIAPP-GFP-expressing cells growing slower than the control cells after 12 h of galactose induction. Regarding the comparison

ppIAPP-GFP, enquanto nenhum efeito foi observado nas estirpes que expressam as restantes fusões. Em células mutantes que expressam o ppIAPP, os níveis de PI permaneceram inalterados, sugerindo que a ausência da protease Kex2, por si só, não é suficiente para exacerbar ainda mais a toxicidade da forma imatura do IAPP (Figura 2). Uma explicação plausível para este resultado relaciona-se com o facto do endereçamento do ppIAPP-GFP para o RE (mediado pelo péptido sinal) poder exacerbar a acumulação das formas imaturas de IAPP e, assim, obstruir a via secretória, criando um problema a montante da clivagem por ação das convertases.

A membrana celular da levedura é conhecida por estar envolvida nos principais processos biológicos, nomeadamente, serve como uma barreira para a difusão de solutos, armazena energia na forma de iões transmembranares e gradientes de soluto, fornece locais de vias enzimáticas envolvidas na síntese de componentes celulares, entre outros. Essas funções são cruciais para manter a homeostasia intracelular e reunir os elementos necessários para o crescimento e divisão celular (34). Uma vez que, em certas condições, a análise do PI mostrou alterações na integridade da membrana (Figura 2), decidimos avaliar de que forma a expressão de diferentes construções de IAPP poderia interferir no crescimento do mutante nulo. Para isso, foram analisadas as curvas de crescimento das estirpes *wild type* e mutante (Figura 3A). As culturas de BY4741 que expressam as três formas de IAPP exibiram um período de latência inicial compatível com a mudança da fonte de carbono de rafinose para galactose. Posteriormente, essas estirpes retomaram o seu crescimento e comportaram-se de maneira semelhante, à exceção das células que expressam o ppIAPP-GFP que cresceram mais lentamente do que as células controlo após 12 h de indução com galactose.

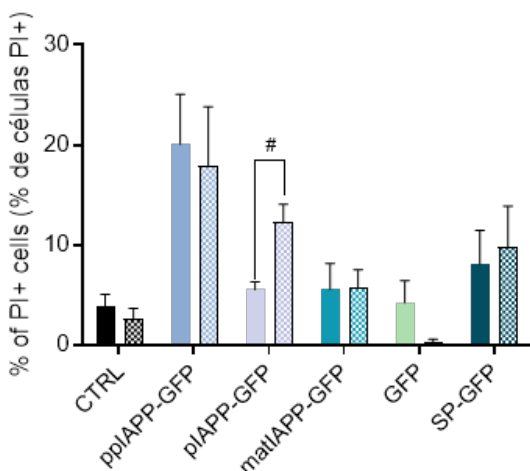


Figure 2 - The frequency of cells positive for propidium iodide (PI) staining of BY4741 and *kex2* cells expressing IAPP-GFP fusions (and the respective control) following 12 h incubation with galactose, as evaluated by flow cytometry. Absence of Kex2 enhances pIAPP-GFP cytotoxicity in this yeast model. # indicates $p < 0.05$ vs respective pIAPP-GFP.

Figura 2 - A frequência de células positivas para a coloração de iodeto de propídio (PI) de células BY4741 e *kex2* expressando fusões IAPP-GFP (e o respectivo controlo) após incubação com galactose durante 12 h, conforme analisada por citometria de fluxo. A ausência de Kex2 aumenta a citotoxicidade induzida pelo pIAPP-GFP neste modelo de levedura. # indica $p < 0.05$ vs respectivo pIAPP-GFP.

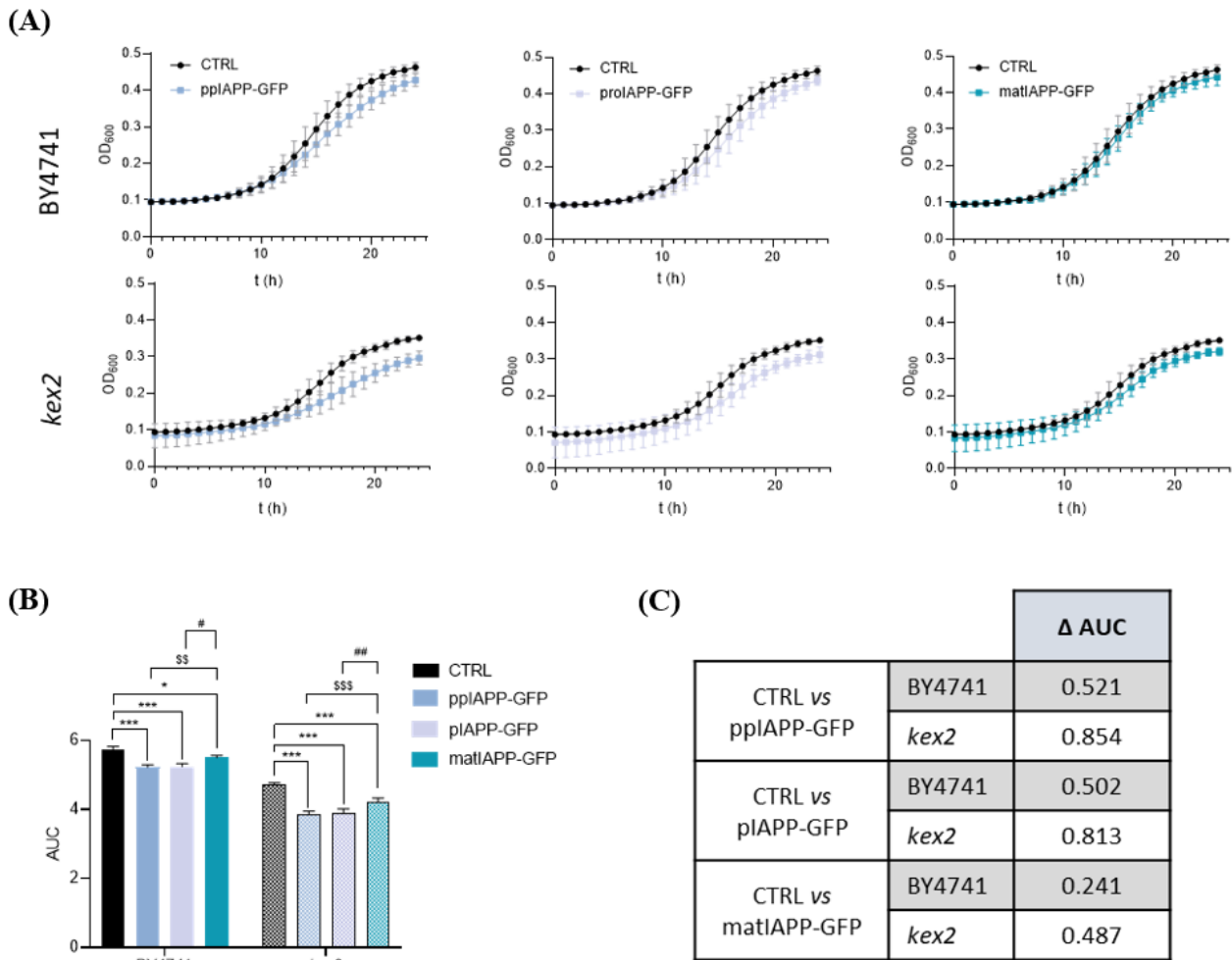


Figure 3 - Growth curve analysis established on culture optical density at 600 nm (OD_{600}) of wild type and *kex2* mutant strains expressing immature and mature IAPP forms. *kex2* mutant strain is represented by bars with patterns. AUC – Area Under the Curve. Values represent \pm SD from at least three independent experiments. Statistical differences are indicated as * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs respective control; $^{SS}p < 0.01$ and $^{SSS}p < 0.001$ vs respective pplAPP-GFP; $^{\#}p < 0.05$ and $^{\#\#}p < 0.01$ vs respective pIAPP-GFP.

Figura 3 - Análise da curva de crescimento com base na densidade ótica da cultura a 600 nm (OD_{600}) de estirpes *wild type* e mutantes *kex2* que expressam formas de IAPP imaturas e maduras. A estirpe mutante *kex2* encontra-se representada por barras preenchidas com padrão. AUC – Área Sob a Curva. Valores representam \pm SD de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas estão indicadas por $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ vs respetivo controlo; $^{SS}p < 0.01$ e $^{SSS}p < 0.001$ vs respetivo pplAPP-GFP; $^{\#}p < 0.05$ e $^{\#\#}p < 0.01$ vs respetivo pIAPP-GFP.

between the growth curves of wild type and mutant strains, a marked difference was observed, with *kex2* cultures showing lower levels of final biomass. Under equal conditions, control BY4741 cultures reached an optical density of 0.43 ± 0.013 after 24 h induction with galactose, whereas control *kex2* culture attained values of 0.35 ± 0.008 at the same time point (Figure 3A). Monitoring of *kex2* culture growth also showed a reduced Area Under the Curve (AUC), when compared to BY4741 cells, supporting the occurrence of growth defects in the mutant strain (Figure 3B). Such results are in accordance with systematic studies showing that *kex2* mutant grows at slower rates in comparison to the isogenic wild type strain (35). Analysis of the AUC also revealed that the absence of Kex2 potentiates growth impairment mediated by ppIAPP-GFP, pIAPP-GFP and matIAPP-GFP expression as concluded by the increase of Δ AUC calculated as the difference between the AUC of the control and the respective IAPP construct (Figure 3C). These results were corroborated by the spot assays showing that cytotoxicity in all strains was enhanced in the *kex2* mutant, in particular in the strains expressing ppIAPP-GFP and pIAPP-GFP (Figure 4).

No que respeita à comparação entre as curvas de crescimento das estirpes *wild type* e mutante, observou-se uma diferença acentuada, com as culturas de *kex2* a apresentar menores valores de biomassa final. Em condições semelhantes, a cultura controlo da BY4741 atingiu uma densidade ótica de $0,43 \pm 0,013$ após 24 h de indução com galactose, enquanto a cultura controlo da *kex2* atingiu valores de $0,35 \pm 0,008$ no mesmo tempo de incubação (Figura 3A). A monitorização do crescimento da cultura *kex2* também mostrou uma área sob a curva (AUC) reduzida, quando comparada às células BY4741, suportando a ocorrência de defeitos no crescimento na estirpe mutante (Figura 3B). Estes resultados vão ao encontro de estudos sistemáticos publicados que mostram que o mutante *kex2* cresce a taxas mais lentas em comparação com a estirpe *wild type* (35). A análise da AUC também revelou que a ausência da Kex2 potencia o comprometimento do crescimento mediado pela expressão do ppIAPP-GFP, pIAPP-GFP e matIAPP-GFP, conforme concluído pelo aumento de Δ AUC calculado como a diferença entre a AUC do controlo e a AUC do respetiva fusão de IAPP (Figura 3C). Estes resultados foram corroborados pelos ensaios fenotípicos que mostraram que a citotoxicidade em todas as estirpes, em particular as que expressam ppIAPP-GFP e pIAPP-GFP, foi aumentada no mutante *kex2* (Figura 4).

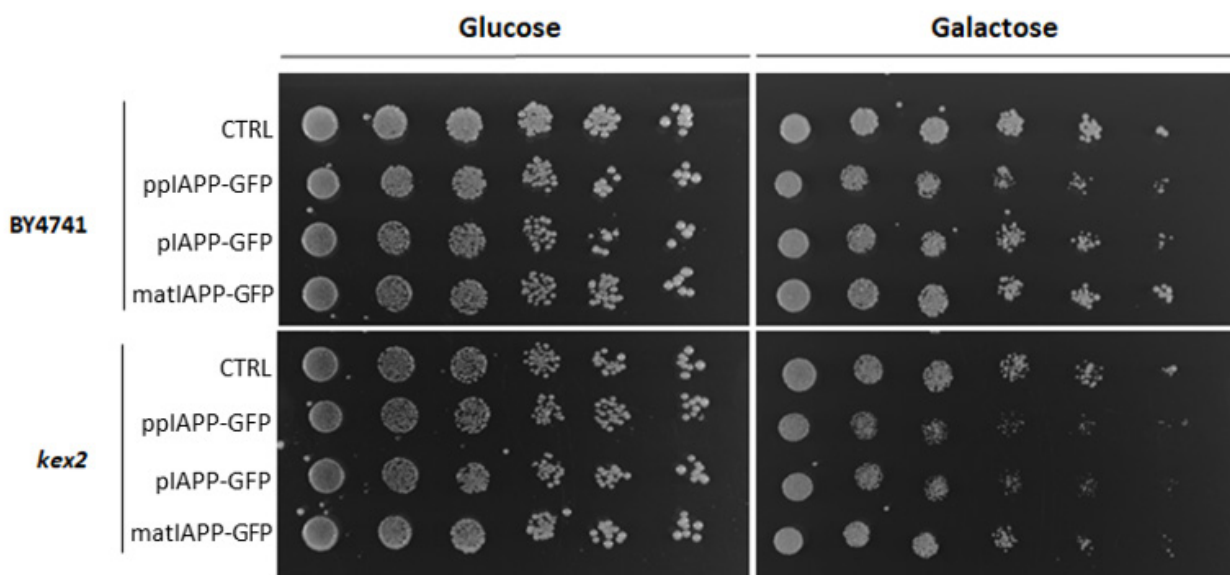


Figure 4 - Phenotypic assays of wild type and *kex2* mutant strains expressing immature and mature IAPP forms.
Figura 4 - Ensaio fenotípicos das estirpes *wild type* e mutantes *kex2* que expressam formas de IAPP imaturas e maduras.

IAPP processing and intracellular distribution are not affected in kex2 mutants

Transmission electron microscopy studies of intracellular amyloid in human IAPP transgenic mice pancreas identified intragranular fibrils containing pIAPP molecules. Fibrils at this location were associated to prohormone processing impairment and consequent pIAPP accumulation (8). In β -cells containing functional processing machinery, expression of pIAPP did not lead to amyloid deposition. On the contrary, pIAPP expression in GHC4 cells lacking PC2 and PC1/3 resulted in amyloid composed of pIAPP

O processamento do IAPP e a sua distribuição intracelular não são afetados em mutantes kex2

Estudos de microscopia eletrônica de transmissão de depósitos amilóides no pâncreas de ratinhos transgênicos para IAPP humano identificaram a presença de fibrilas intragranulares contendo moléculas de pIAPP. As fibrilas presentes neste local foram associadas ao comprometimento do processamento de pro-hormonas e consequente acumulação de pIAPP (8). Em células β contendo uma maquinaria de processamento funcional, a expressão de pIAPP não resultou na formação de depósitos amilóides. Pelo contrário, a expressão de pIAPP em células GHC4 que não possuem as convertases PC2 e PC1/3 resultou na formação

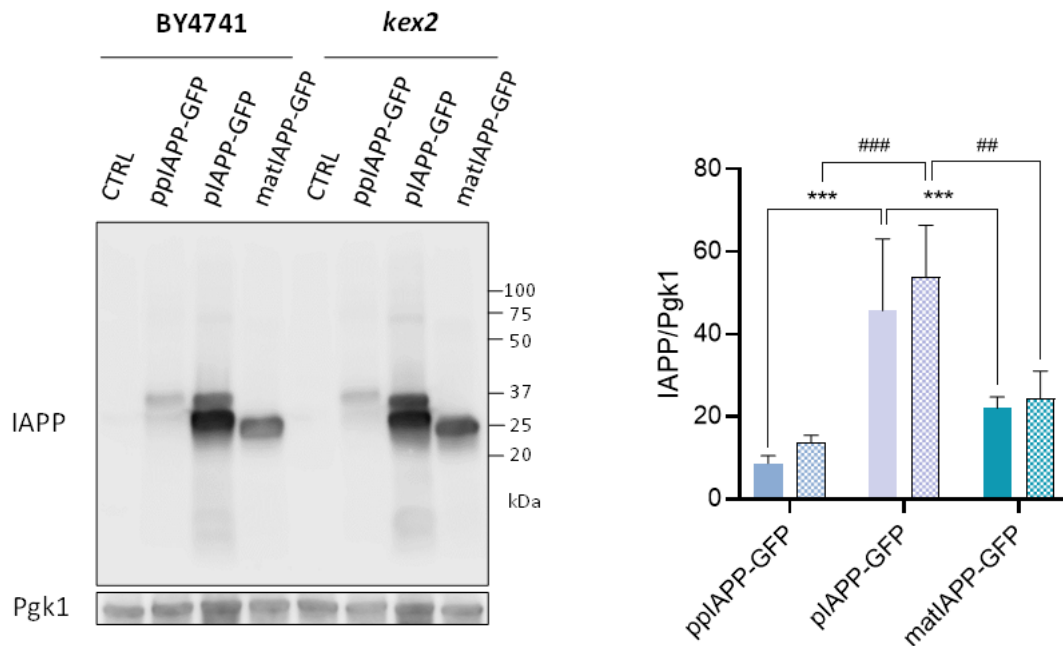


Figure 5 - Lack of Kex2 has no implications for intracellular IAPP processing. BY4741 and *kex2* cells expressing IAPP-GFP fusions and the control were induced for 12 h with galactose, and protein profile was evaluated by immunoblotting using an antibody against IAPP. Pgk1 was applied as loading control. *kex2* mutant strain is represented by bars with patterns. Representative images are displayed, and values represent \pm SD from at least three independent experiments. Statistical differences are indicated by $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ vs respective ppIAPP-GFP or pIAPP-GFP (BY4741); $##p < 0.01$ and $###p < 0.001$ vs respective ppIAPP-GFP or pIAPP-GFP (*kex2*).

Figura 5 - A ausência da proteína Kex2 não afeta o processamento do IAPP. Células BY4741 e *kex2* que expressam fusões de IAPP-GFP ou o vetor controle foram induzidas com galactose por 12 h. O perfil proteico foi avaliado por imunotransferência usando um anticorpo anti-IAPP. O Pgk1 foi usado como controle endógeno. A estirpe mutante *kex2* encontra-se representada por barras preenchidas com padrão. Imagens representativas são mostradas e os valores representam \pm SD de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas são indicadas como $**p < 0.01$ e $***p < 0.001$ vs respectivo ppIAPP-GFP ou pIAPP-GFP (BY4741); $##p < 0.001$ e $###p < 0.001$ vs respectivo ppIAPP-GFP ou pIAPP-GFP (*kex2*).

(36), indicating that abnormal processing is a key factor for the accumulation of amyloidogenic pIAPP intermediates. To verify if increased pIAPP cytotoxicity in *kex2* mutants was linked to the accumulation of IAPP unprocessed forms, we performed immunoblotting assays. As shown in Figure 5, no visible differences were observed in IAPP profile between the two strains. In both cases, total protein samples from cells expressing the most immature form of IAPP showed the presence of a 38 kDa signal which is well-matched with the molecular weight of ppIAPP-GFP. An extra signal of ~32 kDa was also noticed in these samples (Figure 5). In a similar way, total protein samples from cells expressing pIAPP-GFP revealed the existence of a 36 kDa signal, corresponding to the molecular weight of the pIAPP-GFP. Two other signals of ~32 and ~70 kDa were also identified. In the light of these results, we hypothesize that such signals may be associated to the generation of processing intermediates (~32 kDa signals) and dimers (~70 kDa signal) of IAPP species. matIAPP-GFP total protein samples disclosed the existence of a 31 kDa-single signal that should match the polypeptide sequence of the mature construct. Comparable signals were detected in membranes probed with anti-GFP antibody ([Supplementary Figure S2](#)). Also, no significant differences were found in total levels of IAPP between wild type and mutant strains. In both strains, pIAPP-GFP-expressing cells showed higher levels of total IAPP (Figure 5), however with no significant effect on the number of GFP positive cells, as indicated by flow cytometry studies ([Supplementary Figure S1](#)). More robust techniques such as size exclusion chromatography should be useful to elucidate this question.

Confocal microscopy was then used to evaluate the impact of the absence of Kex2 on the subcellular distribution of chimeric proteins. At a first glance, it can be observed that *kex2* cells are larger than the wild type cells, a phenomenon previously reported in the literature. In addition to *S. cerevisiae*, a wide-ranging of phenotypes have been reported for *kex2* deletion mutants in other yeasts. The stated phenotypic descriptions of the respective mutants comprise morphological alterations that seems to be associated with the deficient activity of cell-wall modifying enzymes (24).

amilóide de pIAPP (36). Estes resultados apontaram o processamento anormal como um fator chave para a acumulação de intermediários amiloidogênicos de pIAPP. Para verificar se o aumento da citotoxicidade do pIAPP em mutantes *kex2* estava associado à acumulação de espécies de IAPP não processadas, realizamos ensaios de imunotransferência. Conforme ilustrado na Figura 5, não foram observadas diferenças visíveis no perfil de IAPP entre as duas estirpes. Em ambos os casos, os lisados de proteína total de células que expressam o ppIAPP-GFP revelaram a presença de um sinal de 38 kDa compatível com o peso molecular da fusão ppIAPP-GFP. Um sinal adicional específico de IAPP de ~32 kDa também foi detectado nessas amostras (Figura 5). De forma semelhante, os lisados de proteína de pIAPP-GFP revelaram a presença de um sinal de 36 kDa, correspondente ao peso molecular da fusão pIAPP-GFP. Dois outros sinais de ~32 e ~70 kDa foram também identificados. Tais sinais poderão representar intermediários de processamento (sinais de ~ 32 kDa) e dímeros (sinal de ~ 70 kDa) de espécies de IAPP. Lisados de proteína total de células que expressam matIAPP-GFP revelaram a existência de um único sinal de ~31 kDa que corresponde ao peso molecular da construção madura. Resultados semelhantes foram observados quando as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-GFP ([Figura Suplementar S2](#)). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis totais de IAPP entre a estirpe *wild type* e a mutante. Em ambas as estirpes, as células que expressam o pIAPP-GFP apresentaram níveis mais elevados de IAPP total (Figura 5), porém sem impacto significativo no número de células positivas para GFP, conforme revelado pela análise de citometria de fluxo ([Figura Suplementar S1](#)). Técnicas mais robustas, como cromatografia de exclusão por peso molecular, deverão ser úteis para elucidar essa questão.

Em seguida, foi avaliado por microscopia confocal se a ausência da Kex2 interferia com a distribuição subcelular das proteínas quiméricas. À primeira vista, pode-se observar que as células *kex2* são maiores que as células *wild type*, fenômeno já relatado na literatura. Além da *S. cerevisiae*, um espectro variado de descrições fenotípicas foi relatado para uma variedade de mutantes de deleção *kex2* de outras leveduras. As características fenotípicas descritas para esses mutantes incluem alterações morfológicas que se acredita serem derivadas da atividade deficiente das enzimas modificadoras da parede celular (24).

Regarding protein aggregation, as observed in BY4741 cells, ppIAPP-expressing *kex2* cells exhibited a heterogeneous distribution of well-defined intracellular inclusions (Figure 6A and B), whereas a more diffuse GFP signal was observed in *kex2* cells expressing pIAPP-GFP or matIAPP-GFP. Remarkably, in these cells, less defined aggregates were detected in a non-fluorescent compartment, likely the vacuole, suggesting the accumulation of intravacuolar inclusions. This could represent a cellular defense mechanism through the compartmentalization of toxic protein assemblies. Further experiments are required to elucidate this issue. Although visual inspection suggests that aggregates in ppIAPP-GFP expressing cells seem to be larger and

Em relação à agregação de proteínas, conforme observado nas células BY4741, as células *kex2* que expressam o ppIAPP exibiram uma distribuição heterogênea de inclusões intracelulares bem definidas (Figura 6A e B), enquanto um sinal de GFP mais difuso foi observado nas células *kex2* expressando pIAPP-GFP ou matIAPP-GFP. Notavelmente, nestas células, foram detectados agregados menos definidos num compartimento não fluorescente, presumivelmente o vacúolo, indicando a acumulação de agregados intravacuolares. Tal evidência poderá representar um mecanismo de defesa celular que envolve a compartimentalização de proteínas tóxicas. Experiências adicionais serão necessárias para elucidar esta questão. Embora a inspeção visual sugira que os agregados nas células que expressam ppIAPP-GFP

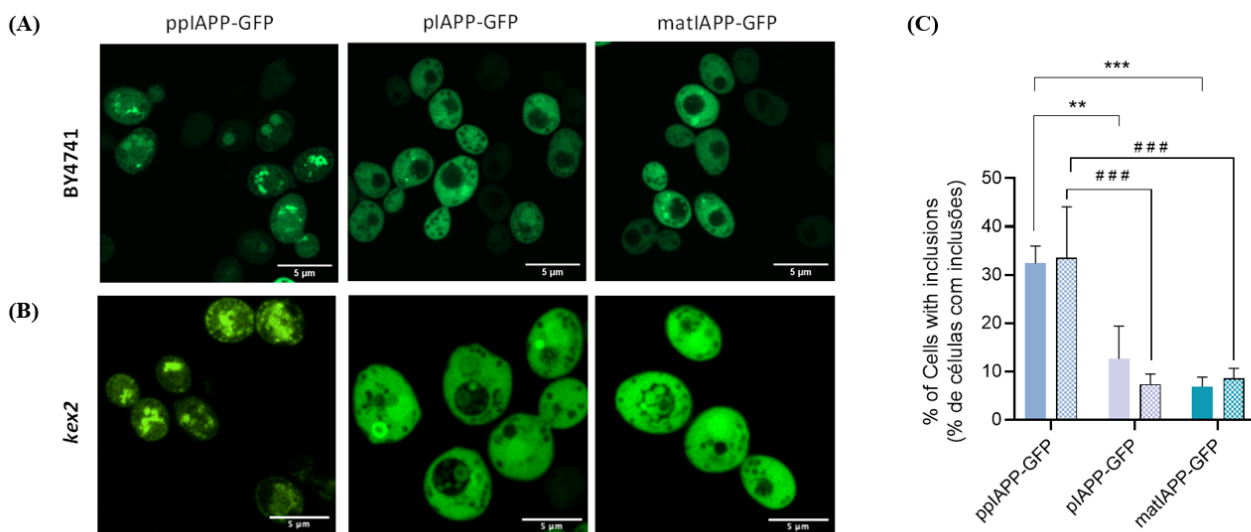


Figure 6 - Lack of Kex2 does not affect intracellular IAPP distribution. BY4741 and *kex2* cells expressing IAPP-GFP fusions and the control were induced for 12 h with galactose. (A) IAPP subcellular distribution in wild type and *kex2* mutant strains expressing immature and mature IAPP forms (at 12 h induction) by confocal fluorescence microscopy. Scale bars correspond to 5 μ m. (B) Cells under the same conditions were assessed by fluorescence microscopy, the number of cells containing inclusions was monitored. *kex2* mutant strain is represented by bars with patterns. Representative images are displayed, and values represent \pm SD from at least three independent experiments. Statistical differences are indicated by ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs respective ppIAPP-GFP or pIAPP-GFP (BY4741); ### $p < 0.01$ and #### $p < 0.001$ vs respective ppIAPP-GFP or pIAPP-GFP (*kex2*).

Figura 6 - A ausência da proteína Kex2 não afeta a distribuição intracelular do IAPP. Células BY4741 e *kex2* que expressam fusões de IAPP-GFP ou o vetor controle foram induzidas com galactose por 12 h. (A) Distribuição subcelular de IAPP em estirpes *wild type* e mutantes *kex2* que expressam formas de IAPP imaturas e maduras (12 h de indução) por microscopia fluorescência confocal. As barras de escala correspondem a 5 μ m. (B) Leveduras sujeitas às mesmas condições foram avaliadas por microscopia de fluorescência, e o número de células contendo inclusões foi monitorizado. A estirpe mutante *kex2* encontra-se representada por barras preenchidas com padrão. Imagens representativas são mostradas e os valores representam \pm SD de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas são indicadas como ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ vs respectivo ppIAPP-GFP ou pIAPP-GFP (BY4741); ### $p < 0.001$ e #### $p < 0.001$ vs respectivo ppIAPP-GFP ou pIAPP-GFP (*kex2*).

more frequent in the *kex2* mutant (Figure 6, A and B), systematic counting of the number of cells containing proteinaceous IAPP inclusions using ImageJ software indicated no differences between the two strains (Figure 6C).

In view of these data, our results do not support the idea of IAPP as a target for Kex2-mediated processing at least in conditions tested. The phenotypic features of *kex2* mutants can be attributed to compromised processing of substrate proteins rendering them dysfunctional and thereby affecting cell growth. An example is the case of the α -pheromone where the deficiency of Kex2-mediated processing disables mutant mating (37). Notwithstanding, the marked increase in cell permeability observed in the *kex2* mutant expressing pIAPP-GFP reveals some degree of response specificity that needs further investigation.

In our study, the absence of Kex2 does not seem to result in cleavage impairment and accumulation of unprocessed forms of pIAPP-GFP. The restricted Kex2 localization in the late trans-Golgi network and prevacuolar compartments explain its limited target spectrum to those proteins anchored to the cell surface or involved in the secretory pathway (24). Accordingly, *kex2* mutants phenotypes have been characterized by the release of incompletely processed protein precursors into the extracellular environment, as the case of the secretory xylanase of *T. reesei* (38). However, evidence has demonstrated that these effects are blurred since the phenotypes described in *kex2* strains may simply be secondary effects themselves. Moreover, failure of Kex2-mediated processing mechanisms may be masked by the function of other proteinases, as the case of yapsins, a family of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked aspartyl proteases (24,39). Further studies are mandatory to better comprehend the role of players involved in the processing of immature forms of IAPP in yeast.

Conclusions

The *kex2* mutants phenotypes have been characterized by the extracellular release of unprocessed protein precursors. Although few proteins have been indicated as possible substrates for Kex2, there is not experimental proof of Kex2 cleavage for the majority of the proteins. There is no reported evidence regarding the effects of Kex2 on the IAPP peptide. Through the generation of a

parecem ser maiores e mais frequentes no mutante *kex2* (Figura 6, A e B), a contagem sistemática do número de células contendo inclusões proteicas de IAPP usando o *software ImageJ* não indicou diferenças entre as duas estirpes (Figura 6C).

Com base nestes dados, os nossos resultados não suportam a ideia de que o IAPP poderá ser um alvo para o processamento mediado pela Kex2, pelo menos nas condições testadas. Os fenótipos dos mutantes *kex2* podem ser atribuídos a falhas no processamento de substratos importantes, tornando-os disfuncionais, e consequentemente afetando o crescimento celular. Um exemplo disso, é o caso da α -feromona, em que a falha do seu processamento mediado pela Kex2 torna o mutante incapaz para efetuar o acasalamento (37). Não obstante, o aumento acentuado na permeabilidade celular mostrado pelo mutante *kex2* que expressa o pIAPP-GFP revela algum grau de especificidade de resposta que necessita de investigação adicional.

No nosso estudo, a ausência da Kex2 não parece resultar no comprometimento da clivagem e na acumulação de formas não processadas de pIAPP-GFP. A localização restrita da Kex2 na rede trans-Golgi tardia e nos compartimentos pré-vacuolares explica o seu limitado espectro a proteínas alvo ligadas à superfície celular ou envolvidas na via secretória (24). Consequentemente, os fenótipos dos mutantes *kex2* têm sido caracterizados pela secreção de proteínas precursoras não processadas para o ambiente extracelular, como é o exemplo da xilanase secretora de *T. reesei* (38). No entanto, evidências demonstraram que esses efeitos não são claros, uma vez que os fenótipos observados nos mutantes *kex2* podem ser devidos apenas à ocorrência de efeitos secundários à mutação. Além disso, a falha no processamento mediado pela Kex2 pode ser mascarada pela atividade de outras proteases, como o caso das yapsinas, uma família de proteases aspárticas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (24,39). Mais estudos serão necessários para entender melhor o papel das enzimas envolvidas no processamento de formas imaturas do IAPP em leveduras.

Conclusões

Os fenótipos dos mutantes *kex2* têm sido caracterizados pela secreção de precursores de proteínas não processados para o espaço extracelular. Embora existam algumas proteínas que têm vindo a ser indicadas como possíveis substratos para a Kex2, o número de proteínas para as quais existe uma prova experimental de clivagem

S. cerevisiae model lacking *KEX2* gene and expressing different chimeric constructs, our study provided novel information about the potential enzymatic activity of this protease on IAPP. The lack of Kex2 reduced cell viability of cells expressing pIAPP, without affecting IAPP processing and intracellular distribution. These data call into question the initially established hypothesis that IAPP would be a potential substrate for Kex2 activity. Additional studies are necessary to better comprehend the mechanisms behind increased pIAPP toxicity in the *kex2* mutant. Moreover, determining the substrates of Kex2 protease would contribute to clarify the phenotypes described in deletion mutants and afford insights into crucial regulatory mechanisms of the cells.

Authors contributions statement

RM conceived and designed the study experiments. SF, AFR and IF executed the experiments. SF, AFR and RM analyzed the data and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Acknowledgements

This study was funded by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, grant numbers PTDC/BIA-MOL/31104/2017 (RM) and UIDB/04567/2020 and UIDP/ 04567/2020 (CBIOS). Authors would like to acknowledge FCT for the financial support of AFR (PD/BD/135504/2018); SF (UI/BD/151421/2021), and RM (CEEC/04567/CBIOS/2020).

Conflict of interests

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

mediada por esta protease permanece baixo. No que diz respeito ao IAPP, não há evidências relatadas sobre os efeitos da Kex2 sobre este péptido. Através da geração de um modelo de *S. cerevisiae* que não possui o gene *KEX2* e que expressa diferentes construções quiméricas, o nosso estudo forneceu novos dados sobre a potencial atividade enzimática desta protease no processamento do IAPP. A ausência da Kex2 reduziu a viabilidade celular das células que expressam o pIAPP, sem afetar o processamento do IAPP e a sua distribuição intracelular. Estes dados colocam em questão a hipótese inicialmente estabelecida de que o IAPP seria um potencial substrato para atividade da Kex2. Estudos adicionais serão necessários para entender melhor os mecanismos que se encontram por detrás do aumento da toxicidade induzida pela expressão do pIAPP no mutante *kex2*. Além disso, conhecer os substratos da protease Kex2 não só ajudará a explicar os fenótipos observados nos mutantes de deleção, como também fornecerá informações úteis sobre os mecanismos de regulação celular.

Declaração de contribuições dos autores

RM concebeu e projetou os experiências. SF, AFR e IF realizaram as experiências. SF, AFR e RM analisaram os dados e redigiram o artigo. Todos os autores contribuíram para o artigo e aprovaram a versão submetida.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, e pelas bolsas PTDC/BIA-MOL/31104/2017 (RM) e UIDB/04567/2020 e UIDP/ 04567/2020 (CBIOS). Os autores gostariam de agradecer à FCT pelo apoio financeiro da AFR (PD/BD/135504/2018), SF (UI/BD/151421/2021) e RM (CEEC/04567/CBIOS/2020).

Conflito de interesses

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que possam ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

References / Referências

1. Mukherjee, A., Morales-Scheihing, D., Butler, P. C., & Soto, C. (2015). Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends in Molecular Medicine*, 21(7), 439–449. doi: 10.1016/j.molmed.2015.04.005.
2. Westermark, P. (1972). Quantitative studies of amyloid in the islets of langerhans. *Uppsala Journal of Medical Sciences*. 77(2), 91-4. doi: 10.1517/03009734000000014.
3. Higham, C. E., Hull, R. L., Lawrie, L., Shennan, K. I. J., Morris, J. F., Birch, N. P., Docherty, K., & Clark, A. (2000). Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) ‘amylin’ by recombinant prohormone convertase enzymes, PC2 and PC3, in vitro. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 4998–5004. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01548.x.
4. Raimundo, A. F., Ferreira, S., Martins, I. C., & Menezes, R. (2020). Islet Amyloid Polypeptide: A Partner in Crime With A β in the Pathology of Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 35. doi: 10.3389/fnmol.2020.00035.
5. Westermark, P., Andersson, A., & Westermark, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological Reviews*, 91(3), 795–826. doi: 10.1152/physrev.00042.2009.
6. Kahn, S. E., Verchere, C. B., D’Alessio, D. A., Cook, D. L., & Fujimoto, W. Y. (1993). Evidence for selective release of rodent islet amyloid polypeptide through the constitutive secretory pathway. *Diabetologia*, 36(6), 570–573. doi: 10.1007/BF02743276.
7. Zhang, X.-X., Pan, Y.-H., Huang, Y.-M., & Zhao, H.-L. (2016). Neuroendocrine hormone amylin in diabetes. *World Journal of Diabetes*, 7(9), 189–197. doi: 10.4239/wjcd.v7.i9.189.
8. Paulsson, J. F., Andersson, A., Westermark, P., & Westermark, G. T. (2006). Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human IAPP and transplanted human islets. *Diabetologia*, 49(6), 1237-46. doi: 10.1007/s00125-006-0206-7.
9. Marzban, L., Trigo-Gonzalez, G., Zhu, X., Rhodes, C. J., Halban, P. A., Steiner, D. F., & Verchere, C. B. (2004). Role of beta-cell prohormone convertase (PC)1/3 in processing of pro-islet amyloid polypeptide. *Diabetes*, 53(1), 141–148. doi: 10.2337/diabetes.53.1.141.
10. Zheng, X., Ren, W., Zhang, S., Liu, J., Li, S., Li, J., Yang, P., He, J., Su, S., & Li, P. (2010). Serum levels of proamylin and amylin in normal subjects and patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 47(3), 265–270. doi: 10.1007/s00592-010-0201-9.
11. Asthana, S., Mallick, B., Alexandrescu, A. T., & Jha, S. (2018). IAPP in type II diabetes: Basic research on structure, molecular interactions, and disease mechanisms suggests potential intervention strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(9), 1765–1782. doi: 10.1016/j.bbmem.2018.02.020.
12. Anguiano, M., Nowak, R. J., & Lansbury, P. T. J. (2002). Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry*, 41(38), 11338–11343. doi: 10.1021/bi020314u.
13. Kim, J., Park, K., Kim, M. J., Lim, H., Kim, K. H., Kim, S.-W., Lee, E.-S., Kim, H. (Henry), Kim, S. J., Hur, K. Y., Kim, J. H., Ahn, J. H., Yoon, K.-H., Kim, J.-W., & Lee, M.-S. (2021). An autophagy enhancer ameliorates diabetes of human IAPP-transgenic mice through clearance of amyloidogenic oligomer. *Nature Communications*, 12(1), 183. doi: 10.1038/s41467-020-20454-z.
14. Huang, C., Gurlo, T., Haataja, L., Costes, S., Daval, M., Ryazantsev, S., Wu, X., Butler, A. E., & Butler, P. C. (2010). Calcium-activated calpain-2 is a mediator of beta cell dysfunction and apoptosis in type 2 diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 339–348. doi: 10.1074/jbc.M109.024190.
15. Abedini, A., & Schmidt, A. M. (2013). Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS Letters*, 587(8), 1119–1127. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.017.
16. Raimundo, A. F., Ferreira, S., Pobre, V., Lopes-da-Silva, M., Brito, J. A., Dos Santos, D. J. V. A., Saraiva, N., Dos Santos, C. N., & Menezes, R. (2022). Urolithin B: Two-way attack on IAPP proteotoxicity with implications for diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1008418. doi: 10.3389/fendo.2022.1008418.
17. Raleigh, D., Zhang, X., Hastoy, B., & Clark, A. (2017). The beta-cell assassin: IAPP cytotoxicity. *Journal of Molecular Endocrinology*, 59(3), R121–R140. doi: 10.1530/JME-17-0105.
18. Chen, J. J., Genereux, J. C., & Wiseman, R. L. (2015). Endoplasmic reticulum quality control and systemic amyloid disease: impacting protein stability from the inside out. *IUBMB Life*, 67, 404–413. doi: 10.1002/iub.1386.
19. Raimundo, A. F., Ferreira, S., Farrim, M. I., Santos, C. N., & Menezes, R. (2020). Heterologous Expression of Immature Forms of Human Islet Amyloid Polypeptide in Yeast Triggers Intracellular Aggregation and Cytotoxicity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2035. doi: 10.3389/fmicb.2020.02035.
20. Fuller, R. S., Brake, A., & Thorner, J. (1989). Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), 1434–1438. doi: 10.1073/pnas.86.5.1434.
21. Brenner, C., Bevan, A., & Fuller, R. S. B. T.-M. in E. (1994). Biochemical and genetic methods for analyzing specificity and activity of a precursor-processing enzyme: Yeast Kex2 protease, kexin. *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases* 244, 152–167. doi: 10.1016/0076-6879(94)44013-1.
22. Kjeldsen, T. (2000). Yeast secretory expression of insulin precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 277–286. doi: 10.1007/s002530000402.
23. Yonemoto, I. T., Kroon, G. J. A., Dyson, H. J., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2008). Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state. *Biochemistry*, 47(37), 9900–9910. doi: 10.1021/bi800828u.
24. Bader, O., Krauke, Y., & Hube, B. (2008). Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology*, 8(1), 116. doi: 10.1186/1471-2180-8-116.
25. Rockwell, N. C., & Fuller, R. S. (2002). Specific modulation of Kex2/furin family proteases by potassium. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17531–17537. doi: 10.1074/jbc.M111909200.
26. Tenreiro, S., & Outeiro, T. F. (2010). Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Research*, 10(8), 970–979. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00649.x.
27. Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast*, 7(3), 253–263. doi: doi.org/10.1002/yea.320070307.
28. Fuller, R.S., Sterne, R.E., & Thorner, J. (1988). Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annual Review of Physiology*, 50, 345–362. doi: 10.1146/annurev.ph.50.030188.002021.
29. Bryant, N.J., & Stevens, T.H. (1997). Two separate signals act independently to localize a yeast late Golgi membrane protein through a combination of retrieval and retention. *The Journal of Cell Biology*, 136(2), 287–297. doi: 10.1083/jcb.136.2.287.
30. Wilcox, C.A., & Fuller, R.S. (1991). Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *The Journal of Cell Biology*, 115(2), 297–307. doi: 10.1083/jcb.115.2.297.
31. Smeekens, S. P., Chan, S. J., & Steiner, D. F. (1992). The biosynthesis and processing of neuroendocrine peptides: identification of proprotein convertases involved in intravesicular processing. *The Peptidergic Neuron*, 92, 235–246. doi: 10.1016/S0079-6123(08)61179-6.
32. Seidah, N., & Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11, 367–383. doi: 10.1038/nrd3699.

33. Rosenberg, M., Azevedo, N. F., & Ivask, A. (2019). Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports*, 9(1), 6483. doi: 10.1038/s41598-019-42906-3.
34. Stewart, G. G. (2017). The Structure and Function of the Yeast Cell Wall, Plasma Membrane and Periplasm. *Brewing and Distilling Yeasts*, ed. G.G. Stewart (Charm: Springer), 55-75. doi: 10.1007/978-3-319-69126-8_5.
35. Marek, A., & Korona, R. (2013). Restricted pleiotropy facilitates mutational erosion of major life-history traits. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 67(11), 3077–3086. doi: 10.1111/evo.12196.
36. Paulsson, J. F., & Westermark, G. T. (2005). Aberrant processing of human proislet amyloid polypeptide results in increased amyloid formation. *Diabetes*, 54(7), 2117-25. doi: 10.2337/diabetes.54.7.2117.
37. Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., & Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell*, 37(3), 1075–1089. doi: 10.1016/0092-8674(84)90442-2.
38. Goller, S. P., Schoisswohl, D., Baron, M., Parriche, M., & Kubicek, C. P. (1998). Role of endoproteolytic dibasic proprotein processing in maturation of secretory proteins in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3202–3208. doi: 10.1128/AEM.64.9.3202-3208.1998.
39. Komano, H., Rockwell, N., Wang, G. T., Krafft, G. A., & Fuller, R. S. (1999). Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, monobasic-specific aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7p). *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 24431–24437. doi: 10.1074/jbc.274.34.24431.