

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



La pérdida del cilio primario inducida por ácido palmítico disocia el complejo PKD2-BECN1 inhibiendo la autofagia en neuronas POMC

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Proteínas y Biotecnología, y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

Camila Alejandra García Navarrete

Directores de Tesis: Dr. Alfredo Criollo y Dra. Valentina Parra

Santiago-CHILE

Junio 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

Camila Alejandra García Navarrete

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Alfredo Criollo

Co-director de Tesis:

Dra. Valentina Parra

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero

Dr. Roberto Bravo-Sagua

Dr. Jaime Riquelme

Financiamiento

La presente tesis fue financiada por los siguientes proyectos: FONDECYT 1211329 (AC)
FONDECYT 1190743 - 1230195 (VP).

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a mis tutores, el Dr. Alfredo Criollo y la Dra. Valentina Para. Bajo la guía de ambos aprendí mucho del quehacer científico. Su apoyo y paciencia durante este proceso fue invaluable para culminar este trabajo, y en especial su guía para decidir realizar un doctorado. En particular, quiero agradecer a Daniel y Catalina del grupo AC, quienes me enseñaron a amar el cilio primario y la autofagia. Me llevo todas sus enseñanzas sobre lo que significa ser científica, y siempre les estaré agradecida por ello. Además, quiero agradecer al Laboratorio de Diferenciación Celular y Metabolismo, por esas salidas de congreso y espacios de conversación, cada seminario aprendía de ustedes y sé que se van a convertir en grandes científicos.

En la misma línea, mis primeros pasos en el mundo de la investigación no hubieran sido posibles sin el Dr. Emanuel Guajardo y Apu. Desde aprender a usar la pipeta hasta estar sola en cultivos (bajo la atenta mirada de Ema), su apoyo ha sido fundamental. No solo me enseñaron ciencia, sino también valores humanos por los que estoy profundamente agradecida. Me alegra mucho haberlos encontrado en mi camino profesional.

Durante mi carrera, he tenido la fortuna de contar con amigos que se han convertido en una gran red de apoyo: Cami, Vale, Moni, Kevin, Ale, Tito, Joaquín, Juanpi, y muchos más. Ustedes han estado a mi lado en los días más felices y difíciles de esta etapa, brindándome un hombro para llorar y su compañía para celebrar. También quiero agradecer a mi pequeño grupo médico: Constanza, Daniela y Gemma. Su profesionalismo y asistencia han cambiado mi vida completamente.

Durante la realización de esta tesis, conocí a una segunda familia científica: REDECA. Este espacio no solo me permitió hacer ciencia, sino también cahuinear, aprender, llorar, divulgar y, a veces, simplemente escapar. Gracias a Jorge por acogerme, a Lili y Nicole por ser mis confidentes, y a Nancy por sus consejos y apoyo.

Entrar a la Universidad no fue una tarea sencilla y quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, por su amor incondicional, sus sacrificios y su constante apoyo. Sin ellos, y sin las incontables velitas encendidas pidiendo apoyo de la Mama, Jesús y mi tía María, este logro no habría sido posible.

Finalmente, quiero agradecer a Ignacio, quien ha estado a mi lado constantemente durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por nuestros almuerzos a horas ridículas, las horas viendo series, planificando las vacaciones y creando recuerdos invaluable. Aún nos quedan muchas aventuras juntos.

Productividad

Asistencia a congresos:

- XLV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 2022.
Póster: García-Navarrete, C., Kretschmar, C., Peña-Oyarzún, D., Morselli, E., Parra, V., Criollo, A. Polycystin-2 and Beclin-1 (PKD2/BECN1): A protein complex in the primary cilium of POMC neurons.
- XXXIV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, 2022.
Póster: García-Navarrete, C., Kretschmar, C., Peña-Oyarzún, D., Morselli, E., Parra, V., Criollo, A. Polycystin-2 forms a complex with Beclin-1 at the primary cilium of POMC neurons.
- XLVI Reunión anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, 2023.
Presentación oral: García-Navarrete, C., Kretschmar, C., Peña-Oyarzún, D., Morselli, E., Parra, V., Criollo, A. Palmitic acid disrupts PKD2/BECN1 complex formation leading to autophagy inhibition in hypothalamic neurons.
- Buenos Aires Conference on Autophagy, Vesicular Trafficking, Mechanisms and Disease (BARC), 2023.
Flash talk: García-Navarrete, C., Kretschmar, C., Parra, V., Toledo, J., Lavandero, S., Morselli, E., Peña-Oyarzún, D., Criollo, A.“PKD2 regulates autophagy by forming a complex with BECN1 at the primary cilium of hypothalamic neuronal cells”.
- ***Premio: SBL Trainee Award, otorgado por la Society for Leucocyte Biology.

Publicación:

1. García-Navarrete, C., Kretschmar, C., Toledo, J., Gutiérrez, K., Hernández-Cáceres, M. P., Bodino, M., Parra, V., Burgos, P. V., Lavandero, S., Morselli, E., Peña-Oyarzún, D., y Criollo, A. (2024). PKD2 regulates autophagy and forms a protein complex with BECN1 at the primary cilium of hypothalamic neuronal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 167256. <https://doi.org/10/gtv4ss>

Índice de contenidos

Financiamiento	3
Agradecimientos	4
Productividad.....	5
Índice de contenidos	6
Índice de tablas y figuras	7
Abreviaturas.....	8
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Autofagia en la mantención de la homeostasis celular.	11
Beclin-1, un componente clave de la maquinaria autofágica.....	12
PKD2, una proteína reguladora de la autofagia.	14
Cilio primario en la regulación de la homeostasis celular.	15
Ácido palmítico (AP) en la modulación de la autofagia.	19
Hipótesis	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos.....	22
Materiales y Métodos.....	25
Resultados.....	32
AP inhibe la autofagia en células N43/5.	34
La pérdida del cilio mediada por AP inhibe la autofagia en neuronas POMC.....	37
El cilio primario es necesario para la formación del complejo PKD2-BECN1.	42
AP disocia el complejo proteico PKD2-BECN1.	44
PKD2 es necesario para la activación de autofagia	45
Discusión	48
PKD2 y BECN1 como moduladores de la autofagia.....	48
AP como actor en la inhibición de la autofagia y la ciliogénesis en neuronas hipotalámicas.	52
El AP inhibe autofagia al romper la formación del complejo PKD2-BECN1 en el cilio primario. ...	54
Conclusiones.....	55
Bibliografía.....	56

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Autofagia inducida por privación de nutrientes.	12
Figura 2. BECN1 forma un complejo proteico con PKD2 a través de su dominio BARA.....	14
Figura 3. Componentes del Cilio Primario.....	17
Figura 4. Regulación bidireccional entre autofagia y ciliogénesis.	19
Figura 5. Modelo propuesto sobre el efecto de AP sobre la formación del complejo PKD2-BECN1 y en la autofagia en neuronas POMC.	21
Figura 6. PKD2 y BECN1 forman un complejo en el cilio primario de la línea celular N43/5.	33
Figura 7. El AP inhibe el flujo autofágico en células N43/5	37
Figura 8. El cilio primario es necesario para la inducción de autofagia en células N43/5.	40
Figura 9. La inducción de ciliogénesis previene el bloqueo de autofagia inducido por AP.....	41
Figura 10. El cilio primario es necesario para la formación del complejo PKD2-BECN1.	43
Figura 11. AP disocia el complejo PKD2-BECN1.....	44
Figura 12. PKD2 es necesario para la activación de la autofagia en células N43/5.....	46

Abreviaturas

AMPK: Quinasa activada por AMP.

AMP: Adenosín monofosfato.

AP: Ácido Palmítico.

ATG: Proteína relacionada a la autofagia.

ARC: Arcuato.

Baf-A1: Bafilomicina.

BECN1: Beclin-1.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CEP164: Proteína centrosomal de 164 kDa.

co-IP: Co-inmunoprecipitación.

IFT88: Proteína de transporte intraflagelar 88.

IgG: Inmunoglobulina G.

LC3: Cadena ligera 3 de las proteínas 1A/1B asociadas a los microtúbulos.

MAP4: Proteína asociada a microtúbulos 4.

mTOR: Blanco mamífero de rapamicina.

PI3KIII: Fosfoinositol 3-quinasa de clase III.

PI3KIII-C1: Fosfoinositol 3-quinasa de clase III complejo 1.

PKD1: Policistina-1.

PKD2: Policistina-2.

PLA: Ensayo de ligación por proximidad.

POMC: Proopiomelanocortina.

Rapa: Rapamicina.

SQSTM1/p62: Sequestesoma-1.

TLR: Receptor tipo toll.

ULK1: Quinasa de proteína serina/treonina ULK1.

Resumen

La autofagia es un proceso crucial para la proteostasis, y diversas proteínas participan en su regulación. Beclin-1 es una proteína fundamental para la biogénesis del autofagosoma, el cual es un organelo que recluta el material citoplasmático a degradar. De forma interesante, nuestro grupo ha reportado recientemente que BECN1 interactúa de forma directa con la proteína policistina-2, formando un complejo necesario para la inducción de autofagia. PKD2 es un canal de calcio que se localiza en la membrana del cilio primario, el cual es un organelo celular que responde a señales mecánicas y químicas necesarias para la mantención de la homeostasis celular. Diversos estudios han dado cuenta sobre la estrecha conexión entre el cilio primario y la autofagia, sin embargo, aún no existe evidencia que asocie la formación del complejo PKD2-BECN1 y la autofagia con la presencia del cilio primario. Entre los estímulos que alteran el flujo autofágico, se ha demostrado que el ácido palmítico (AP) inhibe la autofagia en neuronas liberadoras de proopiomelanocortina, promoviendo desórdenes metabólicos.

Paralelamente, nuestro grupo también ha demostrado que el AP inhibe la ciliogénesis, convirtiéndolo en un estímulo que facilita el estudio tanto de la autofagia como del cilio primario. En este mismo sentido, ha sido ampliamente descrito que AP actúa sobre las neuronas hipotalámicas del núcleo arcuato, específicamente sobre neuronas POMC, las cuales tienen un papel anorexigénico en la ingesta de alimentos. En base a estos antecedentes, el presente trabajo buscó responder si la pérdida del cilio primario inducida por AP disocia el complejo PKD2-BECN1, generando un/el bloqueo de la autofagia en neuronas POMC. Nuestros hallazgos muestran, a través de ensayos de coimmunoprecipitación y PLA, que el complejo proteico PKD2-BECN1 se localiza en el cilio primario de neuronas POMC N43/5. Por otro lado, observamos que el AP inhibe la autofagia, efecto que fue prevenido por medio de la inducción de ciliogénesis. Más aún, mostramos que AP rompe el complejo PKD2-BECN1, necesario para la modulación de autofagia, todo lo anterior evaluado por inmunofluorescencia de marcadores autofágicos. Por lo tanto, este trabajo permitió dar luces sobre un nuevo complejo modulador de la autofagia dentro del cilio primario, el cual depende de la señal de AP, lo que abre puertas a investigaciones futuras que, por ejemplo, busquen solucionar el desbalance energético observado en células POMC bajo condiciones como la obesidad.

Abstract

Autophagy is a crucial process for proteostasis, involving various proteins in its regulation. Beclin-1 (BECN1) is a fundamental protein for the biogenesis of the autophagosome, an organelle that recruits cytoplasmic material for degradation. Interestingly, our group has recently reported that BECN1 directly interacts with the polycystin-2 (PKD2) protein, forming a complex necessary for the induction of autophagy. PKD2 is a calcium channel located in the primary cilium membrane, a cellular organelle that responds to mechanical and chemical signals necessary for maintaining cellular homeostasis. Various studies have noted the close connection between the primary cilium and autophagy; however, there is still no evidence linking the formation of the PKD2-BECN1 complex and autophagy with the presence of the primary cilium. Among the stimuli that alter autophagic flux, it has been demonstrated that palmitic acid (PA) inhibits autophagy in pro-opiomelanocortin-releasing neurons, promoting metabolic disorders.

In parallel, our group has also demonstrated that PA inhibits ciliogenesis, making it a stimulus that facilitates the study of both autophagy and the primary cilium. In this same context, it has been widely described that PA acts on hypothalamic neurons of the arcuate nucleus, specifically on POMC neurons, which have an anorexigenic role in food intake. Based on this background, the present work sought to determine whether PA-induced loss of the primary cilium dissociates the PKD2-BECN1 complex, resulting in the blockage of autophagy in POMC neurons. Our findings show, through co-immunoprecipitation and PLA assays, that the PKD2-BECN1 protein complex is located in the primary cilium of POMC N43/5 neurons. On the other hand, we observed that PA inhibits autophagy, an effect that was prevented by the induction of ciliogenesis. Moreover, we show that PA disrupts the PKD2-BECN1 complex, necessary for the modulation of autophagy, as evaluated by immunofluorescence of autophagic markers. Therefore, this work sheds light on a new autophagy-modulating complex within the primary cilium, dependent on the PA signal, opening doors for future research aimed at addressing the energy imbalance observed in POMC cells under conditions such as obesity.

Introducción

Autofagia en la mantención de la homeostasis celular.

La **autofagia** es un proceso intracelular que se encarga de degradar y reciclar componentes celulares de forma constitutiva al interior de la célula, sin embargo, este proceso también puede ser estimulado en condiciones de estrés, tales como el estrés oxidativo, la privación de nutrientes, altas temperaturas, entre otros (Yu et al., 2018). Así, la desregulación de la autofagia se asocia al desarrollo de distintas patologías metabólicas (Dikic & Elazar, 2018). Se han descrito tres tipos de autofagia: la autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia, siendo esta última la más estudiada. La macroautofagia (de ahora en adelante, autofagia) es un mecanismo de degradación de componentes celulares a través de la vía lisosomal (Satir & Christensen, 2007). Para el desarrollo de la macroautofagia (de ahora en adelante, autofagia) se requiere la participación de distintas proteínas conocidas como ATG, las cuales forman complejos proteicos necesarios para la formación de la vacuola autofágica (Nair et al., 2012). De manera general, el inicio de la autofagia depende de la fosforilación de AMPK, lo que inhibe el complejo mTORC1, y a su vez, la activación de complejo ULK1 (Kim et al., 2011) el cual activa a la proteína **BECN1**. De este modo, BECN1 junto a otras proteínas ATG, darán inicio a la nucleación y elongación del fagoforo, una vesícula de doble membrana la cual secuestra los componentes a degradar, y así formar el autofagosoma (Russell et al., 2013). Durante este proceso, LC3 es conjugado a fosfatidiletanolamina, formando LC3-II, lo que facilita su reclutamiento en la membrana autofágica (Tanida et al., 2004). Por otro lado, también forman parte de este proceso receptores autofágicos como SQSTM1/p62, que se unen directamente a LC3 y se encargan de reconocer los cargos que serán degradados, aumentando la selectividad de sustratos para este proceso, y así dando cuenta del flujo autofágico (Jiang & Mizushima, 2015). Luego, el autofagosoma se fusiona con los lisosomas para formar el autolisosoma, degradando los componentes antes capturados (**Figura 1**). Durante la autofagia, tanto LC3-II como SQSTM1/p62 son degradados, por lo que un aumento en los niveles de SQSTM1/p62 sugiere la inhibición del proceso de fusión entre el autofagosoma y el lisosoma, proceso conocido como “inhibición del flujo autofágico” (Jiang & Mizushima, 2015; Tanida et al., 2004). Así, evaluando la aparición y desaparición de LC3-II y/o SQSTM1/p62 es posible realizar el seguimiento del flujo autofágico celular.

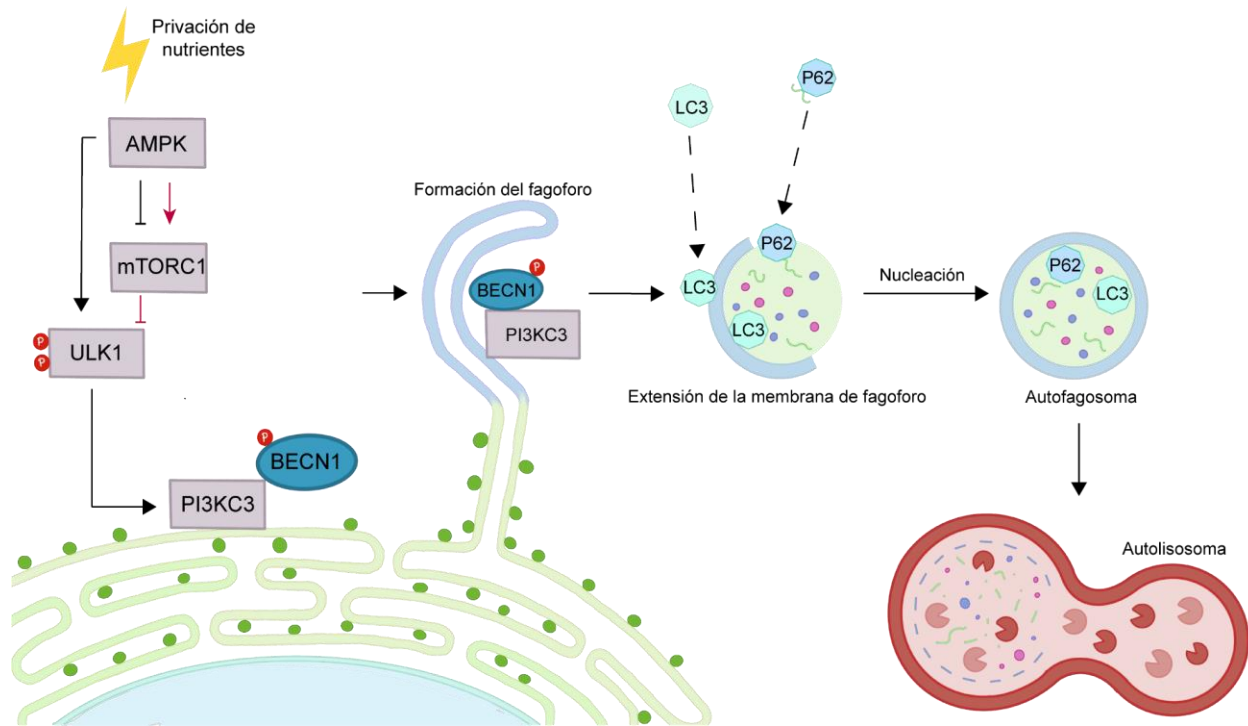


Figura 1. Autofagia inducida por privación de nutrientes.

Una disminución en los niveles de nutrientes genera un aumento en los niveles de AMP, el cual activa alostéricamente la subunidad γ del complejo AMPK (Aledavood et al., 2019). En las líneas negras se presenta la cascada de señalización, en donde se fosforila el complejo ULK1 en los sitios Ser317 y Ser777 (Kim et al., 2011), lo cual induce la fosforilación de BECN1 - del complejo PI3KCIII-C1 - (Russell et al., 2013) para así iniciar la autofagia con la formación de una estructura membranosa denominada "fagoforo". Luego, el fagoforo se elonga y extiende hasta nuclear y formar vesículas llamadas "autofagosomas", las cuales secuestran el material a degradar (Lamb et al., 2013). Finalmente, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar el "autolisosoma", en donde enzimas hidrolíticas degradan los componentes secuestrados por el autofagosoma (Lőrincz & Juhász, 2020). Mientras que cuando no se encuentra un estímulo que favorece la autofagia (líneas rojas), AMPK fosforila a mTORC1, lo cual reduce la fosforilación de AMPK a ULK1 (Leprivier & Rotblat, 2020).

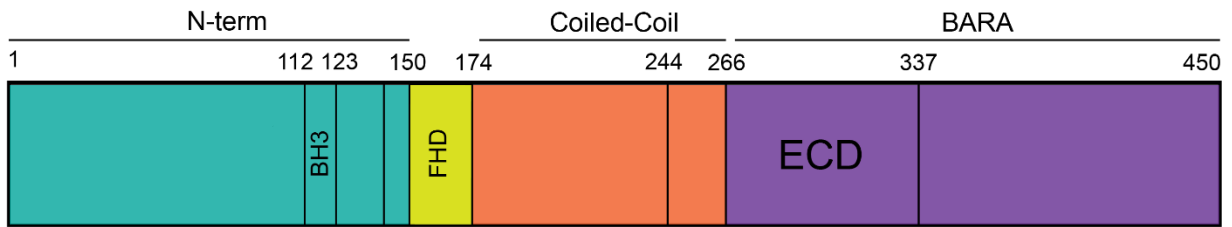
Beclin-1, un componente clave de la maquinaria autofágica.

BECN1 es una proteína esencial para el proceso de la autofagia, y se localiza en diversos compartimentos intracelulares, tales como, el citoplasma, membrana plasmática, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (S. Tran et al., 2021). Esta proteína forma parte del complejo

PI3KCIII, y es activada por fosforilación en los sitios Ser14 y Ser30 (Park et al., 2018; Russell et al., 2013). Esta es una de las señales para iniciar el proceso de nucleación del autofagosoma (Menon & Dhamija, 2018).

Si bien, la proteína recombinante BECN1 no ha sido completamente cristalizada, se han podido identificar los dominios que la componen (Huang et al., 2012; Li et al., 2012; Mei et al., 2016). Por una parte, se encuentra el dominio N-terminal que interacciona con proteínas de la familia BCL-2, los que en conjunto regulan la autofagia debido a que BCL-2 impide el ensamblaje de la estructura pre-autofagosomal, inhibiendo así la autofagia (Decuyper et al., 2012; Pattingre et al., 2005). Adyacente al dominio N-terminal se encuentra la región *coiled-coil*, necesaria para la interacción de BECN1 con ATG14 y que sirve como plataforma para la formación del complejo PI3KCIII-C1. Por lo tanto, esta región es esencial para el proceso de formación de autofagosomas (Kang et al., 2011). Mientras, el dominio *Flexible Helix* (FHD) corresponde a una región de BECN1 parcialmente desordenada que, si no se encuentra unido a alguna proteína, puede formar un trímero. De este modo, al realizar mutaciones en residuos claves (Leu144 y Glu158) para formar el trímero, la respuesta autofágica por privación de nutrientes se ve bloqueada (Mei, Glover, et al., 2016). Por último, se ha identificado el dominio BARA (β - α autophagy-specific), el cual facilita el anclaje de BECN1 en compartimentos de membrana (Mei, Ramanathan, et al., 2016) (**Figura 2A**). De forma novedosa, nuestro grupo ha dado cuenta que BECN1 forma un complejo con la proteína policistina-2 (**PKD2**), a través del dominio BARA, y que este complejo además sería necesario para la inducción de autofagia (**Figura 2B**) (Peña-Oyarzun et al., 2021). Paralelamente, un gran número de estudios han mostrado que PKD2 es una proteína que en células ciliadas se encuentra enriquecida en el cilio primario (Thompson et al., 2021).

A)



B)

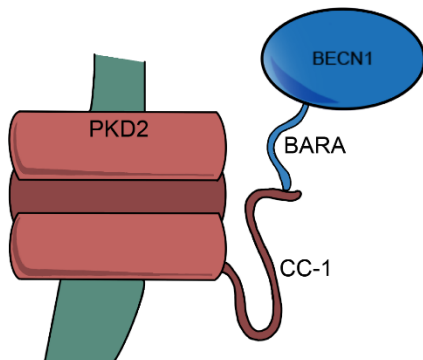


Figura 2. BECN1 forma un complejo proteico con PKD2 a través de su dominio BARA.

(A) BECN1 posee tres dominios principales, en donde su extremo N-terminal (N-term) contiene a la región BH3 necesaria para interactuar con BCL-2, este dominio se une a la región *coiled-coil* a través de la región FHD, esta última adopta una conformación helicoidal que permite la adaptación estructural de BECN1 al unirse a diversas proteínas. Por último, el dominio BARA presenta una región evolutivamente conservada (de sus siglas en inglés, ECD), en donde BECN1 se puede unir a la membrana e interactuar con PI3KCIII-C1. (B) BECN1 se une al dominio *coiled-coil 1* (CC-1) [682-968] de PKD2 a través de su dominio BARA [248-450]. Modificado de Lee, E., et al., 2021, y Peña-Oyarzún, D., et al., 2021.

PKD2, una proteína reguladora de la autofagia.

PKD2 es un canal sensible a calcio (Ca^{2+}) que se localiza en distintos compartimentos de membrana, siendo los más descritos la membrana del cilio primario, retículo endoplásmico y la membrana plasmática. Además, PKD2 tiene una expresión ubicua, que se mantienen durante el estado fetal y adulto (Brill & Ehrlich, 2020). PKD2 pertenece a la familia de canales del potencial receptor transitorio, por lo que su estructura consta de seis dominios transmembrana, los cuales incluyen la zona amino terminal, dominio TOP, además del dominio de mano EF y *coiled-coil* dentro de la región carboxilo terminal (Grieben et al., 2017). La caracterización

funcional de la región amino terminal se encuentra limitada al ser una estructura altamente desordenada (Shen et al., 2016). A pesar de esto, se tiene claro que esta región presenta sitios de fosforilación en Ser76 y Ser80, y su fosforilación permite que PKD2 se trafique a la membrana plasmática, sin afectar su localización en el cilio primario (Geng et al., 2006). El dominio TOP es requerido para la oligomerización del heterotetrámetro entre PKD1 y PKD2 (Su et al., 2018). Por otro lado, en la región carboxilo terminal se encuentra el dominio de mano EF. Mutaciones en esta región abolen la unión a Ca^{2+} , lo que provoca la pérdida de la funcionalidad del canal (Zheng et al., 2018). Finalmente, la región *coiled-coil* es necesaria para que PKD2 forme complejos con otras proteínas, como PKD1, BECN1, IP₃R, RyR, entre otros (Douguet et al., 2019; X. Liu et al., 2022).

La función principal de PKD2 es transducir estímulos mecánicos sentidos por el cilio primario, generando la entrada de flujos de Ca^{2+} para la regulación de distintos procesos celulares, tales como la prevención de la quistogénesis de células renales y la asimetría del patrón izquierdo-derecho del cuerpo durante las fases del desarrollo (Kleene, 2022; Yoshida et al., 2012). De manera interesante, el uso de un inductor de autofagia como la rapamicina genera respuestas positivas en una patología provocada por mutaciones en PKD2, la enfermedad autosómica dominante renal poliquística (de sus siglas en inglés, ADPKD) (Kipp et al., 2018), por lo tanto, disfunciones en PKD2 podrían relacionarse con alteraciones en el proceso de autofagia. Por otro lado, en células HeLa se ha observado que el silenciamiento de PKD2 es suficiente para inhibir la respuesta a señales autofágicas celulares, tales como el mismo uso de rapamicina o la privación de nutrientes (Peña-Oyazun et al., 2021). Más aún, se ha demostrado que PKD2 es suficiente y necesaria para la inducción de la autofagia, y su sobreexpresión puede activar directamente este proceso, lo que puede tener implicaciones terapéuticas en enfermedades como la lesión pulmonar aguda (Pan et al., 2023). En este mismo sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado que PKD2 interactúa de forma directa con BECN1 a través de su dominio *coiled-coil*, específicamente entre los residuos 719-796 (Peña-Oyazún, D., et al., 2020b).

Cilio primario en la regulación de la homeostasis celular.

El cilio primario es un organelo compuesto por un esqueleto de microtúbulos llamado “axonema” y cuyos filamentos consisten de 9 dobletes de microtúbulos ensamblados de forma radial (**Figura 3**) (Satir & Christensen, 2007). El cilio primario se forma durante la fase G_1/G_0 del ciclo celular, en donde un centriolo competente, es decir, uno que presenta un apéndice distal y subdistal, es acoplado a la membrana citoplasmática pasando a llamarse “cuerpo basal”, que luego se elonga para formar al cilio primario (H. Zhao et al., 2023). El cilio primario es un compartimento subcelular que se separa del citoplasma por una barrera de fibras de transición (Garcia-Gonzalo & Reiter, 2017) y su elongación requiere del transporte de proteínas ciliares desde la base hasta la punta del cilio. El transporte de proteínas a lo largo del cilio se realiza mediante la maquinaria conocida como "transporte intraflagelar" (de sus siglas en inglés, IFT), que facilita tanto el movimiento retrógrado como el anterógrado de componentes, contribuyendo al correcto funcionamiento y ensamblaje del axonema (Ishikawa & Marshall, 2011) (**Figura 3**). Experimentalmente, se puede estudiar la función del cilio primario por medio del silenciamiento de proteínas necesarias para su ensamblaje, tales como IFT88, y CEP164. Así, una disminución de los niveles de IFT88 y CEP164 resulta en una buena estrategia para inhibir la ciliogénesis, provocando una disminución de células ciliadas o bien un acortamiento en la longitud del cilio (Čajánek & Nigg, 2014; Pazour et al., 2000). Por otro lado, es posible inducir la ciliogénesis al silenciar la proteína MAP4 (Ávalos et al., 2022). Esta compete con la unión de septinas, las cuales regulan la estabilidad de microtúbulos en el cilio primario. Así, el silenciamiento de MAP4 induce la ciliogénesis al dejar de competir con las septinas (Ghossoub et al., 2013).

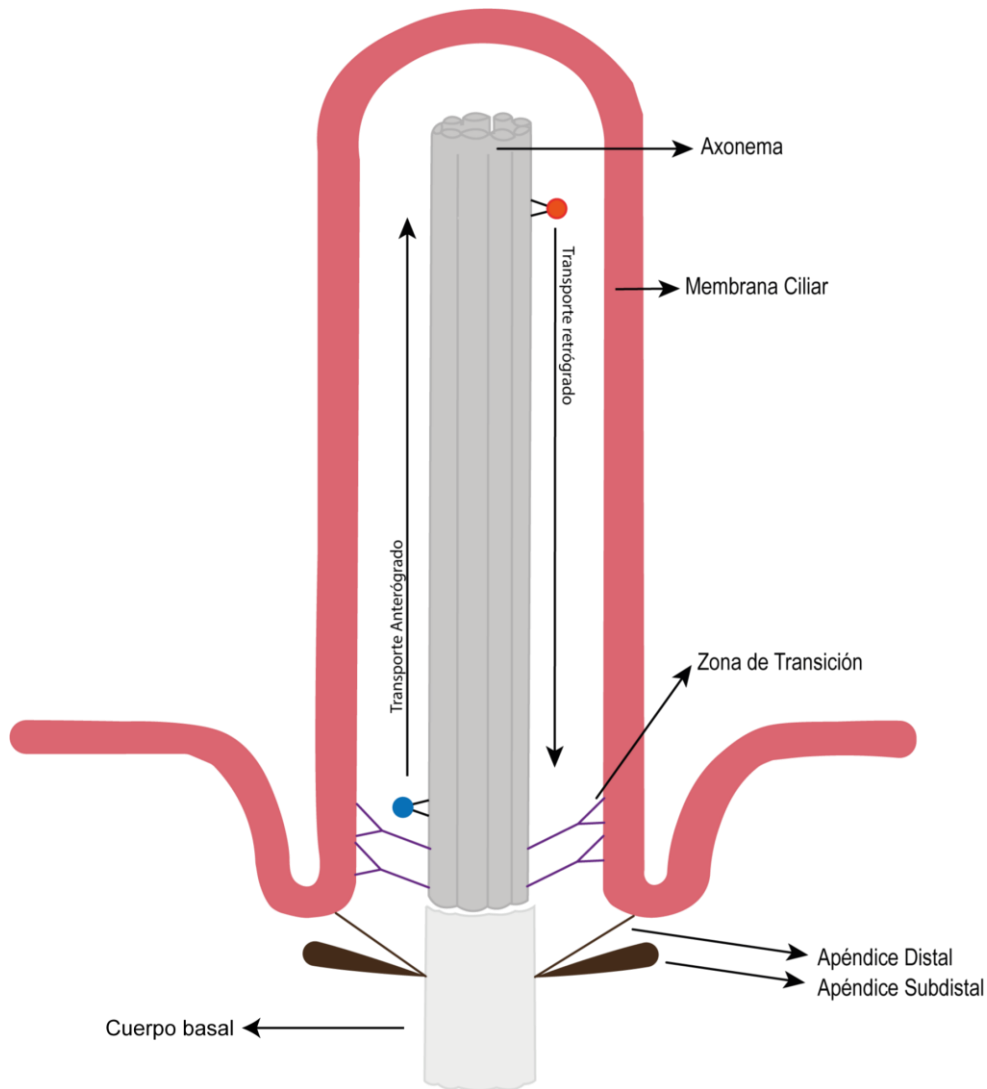


Figura 3. Componentes del Cilio Primario.

El cilio primario está compuesto por 9 dobletes de microtúbulos dispuestos de forma radial, lo que conforma el “axonema”. Además, el cilio primario se encuentra compartimentalizado gracias a la existencia de una “zona de transición” formado por los complejos proteicos Síndrome de Meckel-Grube (MKS) y Nefronoftisis (NPHP), que previenen la difusión hacia la membrana de proteínas solubles entre el cilio primario y la membrana plasmática (Barker et al., 2014; Sang et al., 2011). El axonema también presenta uniones en forma de “Y”, las cuales contribuyen a la estabilidad estructural de la base ciliar (Fisch & Dupuis-Williams, 2011). El cuerpo basal del cilio se compone de un centriolo madre, el cual se encuentra anclado a la membrana gracias a los apéndices distales y subdistales (Hall & Hehnlly, 2021). Finalmente, la elongación del cilio primario es dependiente del transporte retrógrado y anterógrado de proteínas a lo largo del axonema (Avasthi & Marshall, 2012). Modificado de (Yamamoto & Mizushima, 2021)

El cilio primario actúa como una plataforma de señalización, integrando diversas vías como Hedgehog (Hh), Wnt, Notch, y Hippo, entre otros (Pala et al., 2017). El cilio primario puede

ser estudiado mediante microscopía, a través del uso de anticuerpos específicos dirigidos contra proteínas ciliares como ARL13B o tubulina acetilada (Filipova et al., 2020). Estudios indican que existe una regulación bidireccional entre la autofagia y el cilio primario (**Figura 4**) (Orhon et al., 2015; Pampliega et al., 2013; Pampliega & Cuervo, 2016). Por ejemplo, en el caso de la enfermedad crónica pulmonar obstructiva, se ha observado un acortamiento significativo del largo ciliar en cultivos primarios de células epiteliales de tráqueas, mientras que la autofagia en estas condiciones se encontró sobre activada, lo cual fue evaluado al contabilizar el número de puntos de LC3 a través de microscopía electrónica de transmisión. Al mismo tiempo, ratones *becn1*^{+/-} mostraron una resistencia al acortamiento ciliar, sugiriendo que la autofagia regula negativamente la ciliogénesis (Lam et al., 2013). Así, investigadores han propuesto que el acortamiento del cilio primario está mediado por una degradación autofágica de componentes del cilio primario, proceso al cual denominan como “ciliofagia” (Cloonan et al., 2014). Por otro lado, la degradación autofágica de proteínas inhibitoras de la ciliogénesis, tales como, OFD1 y NEK9-MYH9, promueve el ensamblaje del cilio primario, mientras que la presencia de un cilio primario funcional ha demostrado también ser necesaria para la activación de la autofagia en condiciones de privación de nutrientes (Morleo & Franco, 2021). Por otro lado, el cilio primario también sensa el estrés de flujo, el cual corresponde a la resistencia que presenta un tejido a la deformación mecánica por este (Lipowsky, 1995). Esto conduce a la activación de la proteína activadora de tumores (LKB1) en el compartimento ciliar, la cual responde a estímulos de estrés, conduciendo a la activación de AMPK, y la subsecuente inhibición de mTORC1, promoviendo la autofagia (Boehlke et al., 2010). A pesar de los antecedentes que dan cuenta de una relación entre la presencia del cilio y la autofagia, no hay claridad si la formación del complejo **PKD2-BECN1** es parte de la ruta que integra directamente las señales ciliares y de autofagia, y menos aún qué estímulos estarían interviniendo en la formación de este complejo.

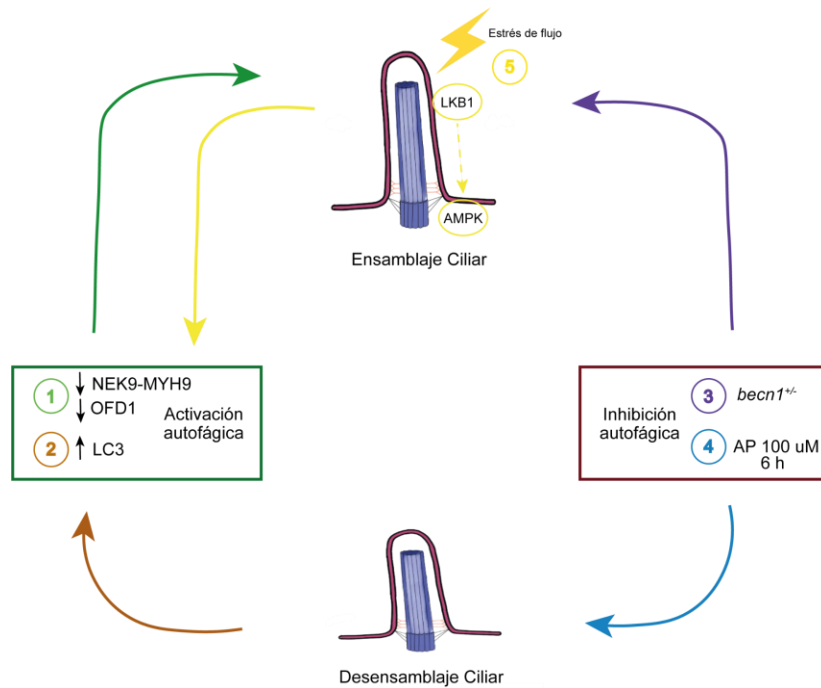


Figura 4. Regulación bidireccional entre autofagia y ciliogénesis.

El esquema presenta diferentes vías que relacionan la función autofágica con la ciliogénesis. En (1) la sobre regulación autofágica genera la disminución de las proteínas NEK9-MYH9 y OFD1, lo que promueve el ensamblaje del cilio primario en un modelo celular renal (Morleo & Franco, 2021). Por otro lado, en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, existen un desensamblaje ciliar, lo que conlleva un aumento de puntos de LC3 (2). Al mismo tiempo, al tener mutantes de *becn1*, se inhibe la autofagia, por lo que aumenta la longitud ciliar (3) (Lam et al., 2013). Además, en células hipotalámicas N43/5, el estímulo con AP 100 μ M inhibe la autofagia, lo que conlleva una disminución en el número y longitud de cilios primarios (Ávalos et al., 2022). Finalmente, (5) en cultivos primarios de células renales, mediante estrés de flujo LKB1 es activada, lo cual conduce a la fosforilación de AMPK y subsecuente inhibición de mTORC1 (Boehlke et al., 2010).

Ácido palmítico (AP) en la modulación de la autofagia.

Los ácidos grasos han mostrado tener un efecto en la modulación de la autofagia (Soto-Avellaneda & Morrison, 2020). Es más, diversos estudios *in vivo* indican que el consumo de dietas altas en grasas conduce a la inhibición de la autofagia en diversos tejidos, entre ellos, el hipotálamo (Meng & Cai, 2011; Portovedo et al., 2015; Reginato et al., 2016). El hipotálamo es un tejido cerebral cuya función es crítica para el control del gasto energético (L. T. Tran et al., 2022) en

donde, el núcleo arcuato (ARC) ha mostrado ser la región clave para la regulación del balance energético (Lieu et al., 2021). El ARC está compuesto mayoritariamente por dos poblaciones neuronales con actividad antagónica (Timper & Brüning, 2017). Por un lado, se tiene a las neuronas que expresan tanto el neuropéptido Y (NPY) como la proteína relacionada a agouti (AgRP), las cuales tienen una función orexigénica, siendo capaces de estimular la sensación de hambre (Beck, 2006). Por otro lado, se encuentran las neuronas que expresan proopiomelanocortina (POMC), cuyo rol es anorexigénico, es decir, activan la sensación de saciedad (Toda et al., 2017). POMC es un pro-péptido que al ser procesado genera la hormona estimulante de α -melanocito (de sus siglas en inglés, α -MSH), la cual activa al receptor 4 de melanocortina logrando así suprimir el reflejo de hambre (Zhan, 2018). El **ácido palmítico** (AP) es un ácido graso saturado que se acumula a nivel hipotalámico en ratones alimentados con dietas altas en grasas o depresión inducida por dieta (Morselli et al., 2014; Vagena et al., 2019) dando cuenta de la relevancia clínica que tiene el estudio de los ácidos grasos en el hipotálamo. Nuestro grupo de investigación ha estudiado el efecto de AP sobre la línea celular N43/5, considerado como un modelo *in vitro* para el estudio de neuronas POMC, demostrando que el tratamiento con este ácido graso provoca no sólo una disminución en el flujo autofágico (Hernández-Cáceres et al., 2019, 2020), sino también un significativo acortamiento de la longitud del cilio primario (Ávalos et al., 2022). En cardiomiocitos neonatos de ratones, el tratamiento con AP induce una acumulación de BECN1 y SQSTM1/p62, lo que da cuenta de una inhibición de la autofagia en la etapa de fusión de autofagosoma-lisosoma (Yuan et al., 2022). A pesar de lo anterior, no hay evidencias sobre el efecto de AP en las proteínas PKD2 y BECN1. Considerando que el complejo PKD2-BECN1 es necesario para la inducción de autofagia (Peña-Oyarzun et al., 2021), y que ambas proteínas se encuentran en el cilio primario, cabe preguntarse si la inhibición de la ciliogénesis inducida por AP bloquea la autofagia debido a la disrupción del complejo PKD2-BECN1 (**Figura 5**).

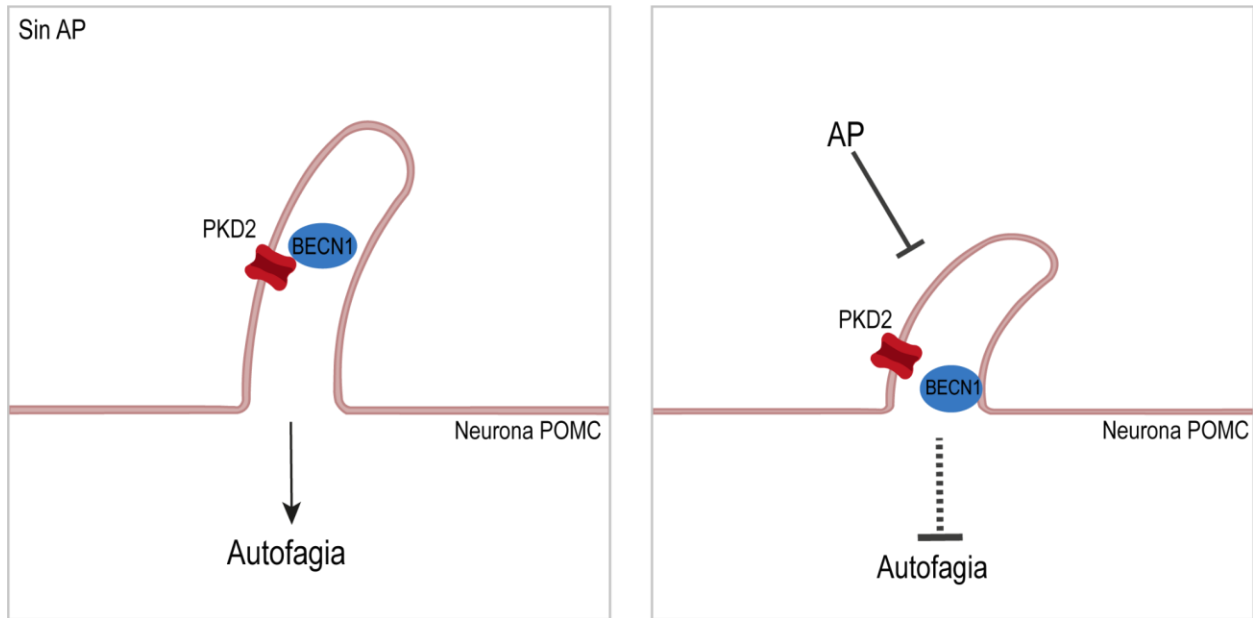


Figura 5. Modelo propuesto sobre el efecto de AP sobre la formación del complejo PKD2-BECN1 y en la autofagia en neuronas POMC.

(A) En condiciones basales, PKD2 forma un complejo con BECN1 (PKD2-BECN1), el cual es necesario para inducir autofagia. **(B)** Ácido palmítico (AP) promueve la inhibición de la ciliogénesis, lo que conllevaría a que no se pueda formar el complejo PKD1/BECN1 en el cilio primario, por lo que la autofagia en esta condición estaría inhibida.

Hipótesis

La pérdida del cilio primario inducida por AP disocia el complejo PKD2-BECN1, generando el bloqueo de la autofagia en una línea celular de neuronas POMC.

Objetivo General

Determinar si la pérdida de cilio primario inducida por AP es suficiente para disociar el complejo PKD2-BECN1 y así bloquear la autofagia en neuronas modelo para POMC.

Objetivos Específicos

Objetivo Específico 1: Evaluar si la pérdida del cilio mediada por AP inhibe la autofagia en una línea celular de neuronas POMC.

Racional: Se ha observado que células modelo para neuronas POMC (N43/5) tratadas con AP presentan una inhibición del flujo autofágico (Hernández-Cáceres et al., 2019, 2020). Adicionalmente, la ausencia de cilio primario reduce significativamente la autofagia (Pampliega et al., 2013). Interesantemente, en nuestro grupo hemos observado que la exposición de células N43/5 a AP provoca una disminución significativa del número de células ciliadas y la longitud ciliar (Ávalos et al., 2022). Sin embargo, no hay datos que muestran que la pérdida del cilio mediada por AP inhibe la autofagia en las neuronas POMC.

Diseño experimental: Como un modelo *in vitro* de neuronas POMC se utilizó la línea celular de ratón N43/5. El flujo autofágico se determinó mediante el análisis de puntos fluorescentes de SQSTM1/p62 a través del uso de anticuerpos específicos y subsecuente microscopía confocal. Además, se usó la línea celular N43/5 con un constructo estable para LC3-GFP-mCherry. Para evaluar el papel del cilio primario sobre la autofagia, se generó una línea estable deficiente para la proteína CEP164 (N43/5 *cep164*^{-/-}), la cual es necesaria para la ciliogénesis. Posteriormente, se evaluó la autofagia por medio de la inmunofluorescencia de SQSTM1/p62. Se realizó la mantención del cilio primario al utilizar el siRNA para MAP4, herramienta que ha demostrado mantiene la estructura ciliar (Ávalos et al., 2022). En todas estas líneas celulares se realizó el

tratamiento con AP por 2 h, mientras que como control positivo para el bloqueo del flujo autofágico se utilizó Bafilomicina-A1 50 nM. Como condición control, las células se trataron con el vehículo BSA.

Objetivo Específico 2: Determinar si el cilio primario es necesario para la formación del complejo PKD2-BECN1.

Racional: En células HeLa se ha observado que PKD2 interactúa de forma directa con BECN1 a través de la región CC1 de PKD2 (Peña-Oyarzun et al., 2021). Por otro lado, PKD2 es una proteína que se encuentra enriquecida en el cilio primario, que además de su función como canal de calcio en respuesta a un estímulo mecánico, promoviendo la autofagia, al formar un complejo con BECN1 (Peña-Oyarzun et al., 2021). Datos preliminares de nuestro grupo muestran que tanto PKD2 como BECN1 se localizan en el cilio primario de células N43/5. Sin embargo, aún no se ha evaluado si el cilio primario es necesario para la formación del complejo PKD2-BECN1

Diseño experimental: Para evaluar si el cilio primario es necesario para la formación del complejo PKD2-BECN1, se utilizó el modelo celular N43/5 *cep164^{-/-}*, el cual no presenta cilio primario. Posteriormente, se realizó una co-inmunoprecipitación (coIP) de PKD2 y BECN1. Para apoyar los resultados de coIP, se realizó el ensayo de ligación por proximidad (PLA) para evaluar la presencia del complejo PKD2-BECN1 en el cilio.

Objetivo Específico 3: Estudiar si el AP disocia el complejo PKD2-BECN1.

Racional: PKD2 es una proteína que se localiza en el cilio, a la cual en el último tiempo se le han atribuido funciones sobre la regulación de la autofagia. Además, al unirse con BECN1, induce la autofagia en células HeLa (Peña-Oyarzun et al., 2021). Datos preliminares de nuestro grupo de trabajo han mostrado que tanto PKD2 como BECN1 se localizan en el cilio primario de la línea celular N43/5, y que el tratamiento con AP induce la pérdida de este organelo (Ávalos et al., 2022). Sin embargo, a pesar de todo lo anterior, se desconoce el efecto de AP sobre el complejo PKD2-BECN1.

Diseño experimental: Como modelo se utilizó la línea celular N43/5. Para determinar si AP influye en la mantención del complejo PKD2-BECN1, se mantuvieron las células N43/5 con y sin AP 100 μ M durante 2 h para luego realizar la coIP de PKD2 y BECN1. Junto con esto, se realizaron experimentos de PLA para evaluar el efecto del AP sobre el complejo PKD2-BECN1. Adicionalmente, para determinar que PKD2 modula la autofagia, es que se utilizó una línea celular deficiente de PKD2, y se realizó un análisis de puntos de SQSTM1/p62. Además, se realizó el silenciamiento de PKD2 en la línea celular LC3-GFP-mCherry, para luego realizar un análisis de puntos de LC3.

Materiales y Métodos

Línea Celular: Como modelo de estudio *in vitro* de neuronas POMC se utilizó la línea celular neuronal hipotalámica N43/5, la cual es una línea embrionaria de ratón. Se generaron líneas celulares *knockout* a través de CRISPR/Cas9 para PKD2 y CEP164. Además, se utilizó la línea celular N43/5 con un constructo estable LC3-GFP-mCherry para realizar análisis de flujo autofágico a través de microscopía. Las células se mantuvieron en medio DMEM (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), suplementado con 10% FBS, penicilina/estreptomicina 1% p/v en incubador a 37 °C / 5% CO₂ hasta alcanzar una confluencia de 60-70%, en este punto se realiza una privación de suero al 1% de FBS para estandarizar la función metabólica celular (Pirkmajer & Chibalin, 2011).

Línea celular N43/5 deficiente del gen *pkd2*^{-/-} (N43/5 *pkd2*^{-/-}): Los ARN guías (sgRNA) necesarios para la delección del gen *pkd2* por medio de la técnica CRISPR/Cas9 fueron los siguientes: Target 1--150:CGAGATGGAGCGCATCCGGC; Target 2--223:TGCCTGGAGCAGGACGAAAG; Target 3--638:AGTACCTGAAAAGTGTGTTA. Se realizó la transfección Lentiviral según las especificaciones del fabricante (NM_008861, abm).

Preparación BSA y AP: Para la preparación de una solución 20 mM de AP se pesaron 26 mg del ácido graso, los cuales se incubaron con una solución 1 M de NaOH a 70°C por 30 min. Esta solución inicialmente luce turbia, por lo tanto, se debe agregar de forma secuencial suficiente volumen de 1M NaOH hasta llegar a una solución transparente. Inmediatamente después, se debe acomplejar el AP con BSA 20% en una relación 1:3,3.

Tratamiento con AP e inductores de autofagia: Las células se privaron de nutrientes por 16 h antes del estímulo con medio DMEM suplementado al 1% con FBS. Luego, se expusieron a 100 µM de AP. BSA se utilizó como vehículo de AP. Además, las células se trataron con Bafilomicina 50 nM, o Rapamicina 1 µM, como controles para la inhibición y activación del flujo autofágico, respectivamente. Los tiempos de exposición fueron 2 h para PA, 4 h para Bafilomicina y 1 hora para Rapamicina según lo visto en las investigaciones de Hernández-Cáceres, M., *et al.*, y Peña-Oyarzun, *et al.*

Silenciamiento de MAP4: El silenciamiento de la proteína MAP4 fue realizado utilizando una concentración de 120 nM de siRNA específico (Santa Cruz, sc-77385), los que fueron transfectados utilizando Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen, 13778-150) y medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, 51985-034), según las especificaciones del fabricante. La validación se realizó a través de Western Blot y conteo de cilios.

Microscopía de Fluorescencia: Células N43/5 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una confluencia del 60-70%, fijadas en PFA 4% por 15 min y permeabilizadas con Tritón X-100 0.1% por 30 min. Luego, las muestras fueron bloqueadas con BSA 3% y lavadas con PBS 1X. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, mientras que el secundario se incubó por 1 hora a temperatura ambiente (concentración 1:500). Los núcleos fueron marcados utilizando Hoechst 33342 a una concentración de 1:10.000 por 10 min. Finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos utilizando Dako Fluorescence Mounting Medium. El análisis de microscopía confocal se realizó con el equipo Nikon C2+ Espectral. Los anticuerpos utilizados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Anticuerpos primarios para la inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Fabricante	Reactividad	Dilución
Policistina-2 (PKD2)	Abcam, ab72273	Ratón	1:500
Tubulina Acetilada	Cell Signaling, 5335S	Conejo	1:1000
Beclin-1 (BECN1)	Abcam, ab62557	Conejo	1:500
ARL13B	Abcam, 136648	Ratón	1:1000
SQSTM1/p62	Abnova, H00008878-M01	Ratón	1:500

Análisis de cilios primarios: Para la adquisición de imágenes, se empleó Tubulina Acetilada o ARL13B como marcador ciliar. Se capturaron imágenes en el eje Z con una separación de 0.2 µm entre cada corte, y se procedió a efectuar el conteo y análisis de la longitud ciliar de manera manual mediante el software ImageJ.

Co-inmunoprecipitación: Las células fueron lavadas con PBS y las proteínas extraídas con buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas (ThermoFisher, A32955) y fosfatasa

(ThermoFisher, A32957). Se utilizó Proteína G agarosa (Kirkegaard & Perry Laboratories, 223-51-00) que fueron conjugadas con 2 µg de anticuerpo (Santa Cruz, sc-48341) y luego incubados con 500 µg de los extractos proteicos a 4°C toda la noche. La proteína G se resuspendió en buffer Laemlli y denaturó a 95°C. Se utilizaron geles al 8% para realizar el análisis de BECN1 y PKD2. Se revelaron las membranas utilizando los reactivos quimioluminiscentes ECL-A y ECL-B (ThermoFisher Scientific) en un equipo ChemiDoc Imaging System Bio-Rad. La cuantificación densitométrica de las imágenes se realizó con el programa ImageJ. Todo esto según el protocolo de Peña-Oyarzun, D., *et al.*, 2020. Los anticuerpos utilizados para Western Blot fueron los siguientes:

Tabla 2. Anticuerpos primarios para Western Blot.

Blanco	Fabricante	Reactividad	Peso Molecular (kDa)	Dilución
Policistina-2 (PKD2)	Almone Labs, ACC-052	Rabbit	120	1:2000
Beclin-1 (BECN1)	Santa Cruz, sc-11427	Rabbit	60	1:2000
MAP4	Santa Cruz, sc-390286	Mouse	120	1:500

Ensayo de ligadura de proximidad: Luego de lavar las células con PBS, estas se fijaron con PFA 4% por 15 min, para luego procesar las muestras según el protocolo de fabricante de Duolink (Sigma- Aldrich, DUO92101). Se utilizaron anticuerpos contra PKD2 (abcam, ab72273) y BECN1 (Santa Cruz, sc-48341) marcados con una sonda que dará una señal positiva si los anticuerpos se mantienen a una distancia menor a 40 nm. Las imágenes se obtuvieron utilizando el microscopio CellObserver, que presenta una cámara ultrasensible EMCCD Evolve 512 Delta para la adquisición de imágenes puntos. Las imágenes se analizaron con el programa Icy.

Análisis de imágenes de células N43/5 LC3-GFP-mCherry: Para lograr el conteo de puntos LC3 fluorescentes correspondientes a autofagosomas, dada por la co-localización de puntos fluorescentes verde (GFP) y rojo (mCherry), se desarrolló la siguiente macro compatible con ImageJ, en donde el umbral fue determinado de forma manual:

```
// Set the binary processing options for "Black background" and "Do nothing"
run("Options...", "iterations=1 count=5 black do=Nothing");

// Prompt the user to open an image for analysis
waitForUser("Abre una imagen para analizar");

// Store the title of the image
imageTitle = getTitle();

// Split the image into individual channels
run("Split Channels");

// Print the title of the image
print(imageTitle);

// Close the channel 1 image
close("C1-" + imageTitle);

// Loop through channels 2 and 3
for (channel = 2; channel < 4; channel++) {

    // Select the current channel window
    selectWindow("C" + channel + "-" + imageTitle);

    // Open the threshold adjustment window
    run("Threshold...");

    // Prompt the user to adjust the threshold and apply
    waitForUser("Elige el threshold y apply");

    // Convert the image to a binary mask
```

```
run("Convert to Mask");

// Apply the despeckle filter to reduce noise
run("Despeckle");

// Apply the watershed algorithm to separate touching objects
run("Watershed");

// Perform particle analysis on objects with size >= 10 pixels, add them to ROI manager, and
summarize
run("Analyze Particles...");

// Don't show the particles in the ROI manager
roiManager("Show None");

// If it's the first iteration (channel 3), delete all ROIs and close the manager
if (channel == 2) {
    roiManager("delete");
    close("Roi Manager");
}
}

// Select the channel 3 image
selectWindow("C2-" + imageTitle);

// Set the measurement options to calculate and display the mean intensity
run("Set Measurements...", "mean display redirect=None decimal=3");

// Get the number of ROIs
totalROIs = roiManager("count");
```

```
// Set the initial count of ROIs with signal in channel 2 to the total number of ROIs
signalCount = totalROIs;

// Loop through each ROI
for (roi = 0; roi < totalROIs; roi++) {

    // Select the current ROI
    roiManager("select", roi);

    // Measure the current ROI
    roiManager("measure");

    // If the mean intensity of the ROI is 0, rename it to "Empty" and decrease the count of ROIs
    with signal
    if (getResult("Mean", 0) == 0) {
        roiManager("rename", "Empty");
        signalCount = signalCount - 1;
        print("Vamos en el ROI n°" + roi + " de " + roiManager("count"));
    }

    // Close the results window
    close("Results");
}

// Sort the ROIs in the manager
roiManager("sort");

// Print the total number of ROIs in channel 2 that had signal in channel 3
print("Había un total de " + signalCount + " ROIS del rojo que tenían verde");
```

Análisis estadístico: Los datos de al menos tres experimentos independientes se representaron gráficamente como promedio \pm SEM. La significancia estadística se determinó realizando un t-test (para dos muestras) o ANOVA seguido por un ensayo Bonferroni post hoc (para tres o más muestras). Se aceptó como estadísticamente significativa una significancia igual o inferior al 5% ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 8.

Resultados

PKD2 y BECN1 forman un complejo, y ambas proteínas se localizan en el cilio primario de células N43/5.

Para examinar la presencia de BECN1 y PKD2 en el cilio primario, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para cada proteína y se analizó visualmente la co-localización de BECN1 o PKD2 con la proteína ARL13B, la cual localiza específicamente en el cilio primario (Duldulao et al., 2009). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron que tanto BECN1 como PKD2 se localizan en el cilio primario de células N43/5 (**Figura 6A**). Además, estos resultados mostraron ser consistentes cuando se realizó un triple marcaje de PKD2, BECN1 y ARL13B, observándose una co-localización de estas tres proteínas (**Figura 6B**), que además fue consistente con la cuantificación de estos (**Figura 6C**). En conjunto, estos resultados indican que BECN1 y PKD2 se localizan en el cilio primario de células N43/5.

Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo ha demostrado previamente que BECN1 y PKD2 forman un complejo proteico en células HeLa, específicamente en el retículo endoplásmico (Peña-Oyarzun et al., 2021). Por lo tanto, dado que identificamos a BECN1 y PKD2 en el cilio primario de células N43/5, a continuación se evaluó si estas proteínas forman un complejo proteico en esta línea celular. Para responder esta pregunta, llevamos a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación de BECN1 y PKD2 en células N43/5. Así, nuestros resultados revelaron que BECN1 y PKD2 co-inmunoprecipitan, lo cual no fue observado cuando se usó un anticuerpo no relacionado (IgG de Ratón) o bien cuando se realizó la co-inmunoprecipitación en una línea deficiente para la proteína PKD2 (N43/5 *pkd2*^{-/-}) (**Figura 6D**).

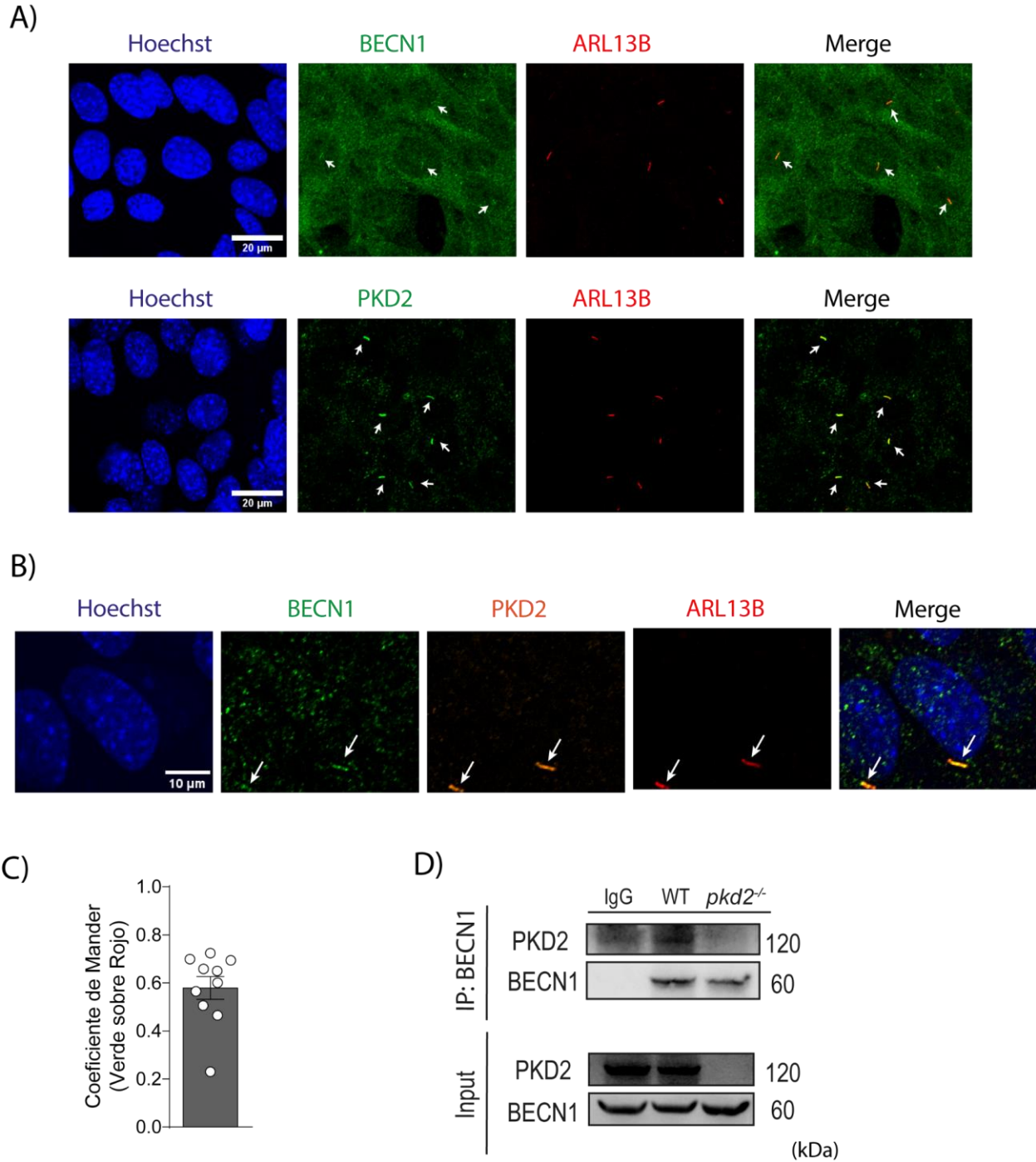


Figura 6. PKD2 y BECN1 forman un complejo en el cilio primario de la línea celular N43/5.

(A) Células N43/5 fueron sembradas y fijadas con PFA 4%, para posteriormente realizar la incubación con los anticuerpos BECN1 (Abcam, ab62557), PKD2 (Abcam, ab72273) y ARL13B (Abcam, 136648). Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal, y las fotos representativas son mostradas (n=3). (B) Se realizó un triple marcaje utilizando el protocolo anterior en células N43/5, en donde se realizó la incubación con los anticuerpos BECN1 (Abcam, ab62557), PKD2 (ThermoFisher, PA5-19175), ARL13B (Abcam, 136648). Las

imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal, y las fotos representativas son mostradas (n=3). Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**A-B**). Escala = 10 μm . (**C**) Co-localización de BECN1 y PKD2 en relación a la estructura ciliar. El Coeficiente de Manders se analizó a través del plugin JaCoP de Fiji/ImageJ (n=3). (**D**) Células N43/5 fueron sembradas a una confluencia de 70-80%. Luego, se prepararon extractos proteicos totales y BECN1 fue inmunoprecipitado con anticuerpos específicos. Un anticuerpo no relacionado (IgG) fue usado como control. Posteriormente, la co-inmunoprecipitación de BECN1 y PKD2 fue evaluado por Western Blot (n=3). Escala = 10 μm .

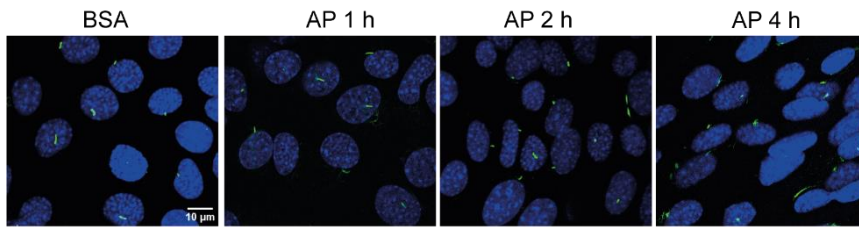
AP inhibe la autofagia en células N43/5.

Considerando que AP 100 μM disminuye significativamente el número y largo ciliar en células N43/5 después de 2 h de tratamiento (**Figura 7A-C**), se evaluó la temporalidad en la que AP altera el proceso autofágico, permitiendo definir de este modo el tiempo de estímulo con AP para los siguientes experimentos. Para responder lo anterior, se realizó una curva temporal con estímulos de AP 100 μM (0.5, 1, 2 y 4 h). El flujo autofágico fue monitoreado utilizando el marcador SQSTM1/p62, analizando el número de puntos y el área de estos a través de microscopía confocal. Como se pudo observar, el número y área de los puntos SQSTM1/p62 cambiaron en las células estimuladas con AP a distintos tiempos, en comparación con el control BSA. Además, en estos experimentos también evaluamos el efecto de Baf-A1, el cual se usó como control positivo para el bloqueo del flujo autofágico (**Figura 7D**). Al analizar el número de puntos SQSTM1/p62, observamos que estos aumentaron significativamente después de una hora de tratamiento con AP, los cuales posteriormente disminuyeron (**Figura 7D-E**). Por otro lado, el área de puntos SQSTM1/p62 aumentó significativamente a partir de una hora de tratamiento con PA, el cual se mantuvo hasta las 4 h (**Figura 7D y 6F**). En resumen, los resultados mostraron que AP inhibe el flujo autofágico en células N43/5. Así, dado que la pérdida del cilio primario y la inhibición autofágica ocurren a las 2 h de tratamiento con AP 100 μM (**Figura 7A y 6D**), se eligió esta temporalidad para los posteriores experimentos.

Para confirmar que AP bloquea el flujo autofágico, se utilizó la línea celular N43/5 LC3-GFP-mCherry, que expresa de manera estable la proteína de fusión LC3 con GFP y mCherry. Esta línea celular permitió evaluar el flujo autofágico mediante fluorescencia, evidenciando la presencia de autofagosomas (puntos fluorescentes amarillos) y autolisosomas (puntos fluorescentes rojos). De esta manera, observamos que células N43/5 LC3-GFP-mCherry

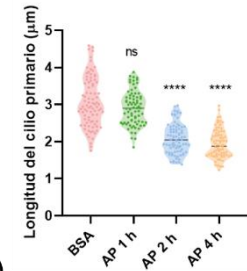
tratadas con AP, 100 μ M, durante 2 h muestran una disminución significativa en el número de autolisosomas (puntos fluorescentes rojos), respecto a las células tratadas con BSA (control). Sin embargo, no observamos cambios en el número de autofagosomas en las células tratadas con o sin AP (**Figura 7G-H**). Por lo tanto, estos datos confirman que AP bloquea el flujo autofágico después de 2 h de tratamiento.

(A)

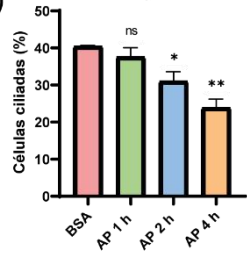


Tub. Ac/Hoechst 33342

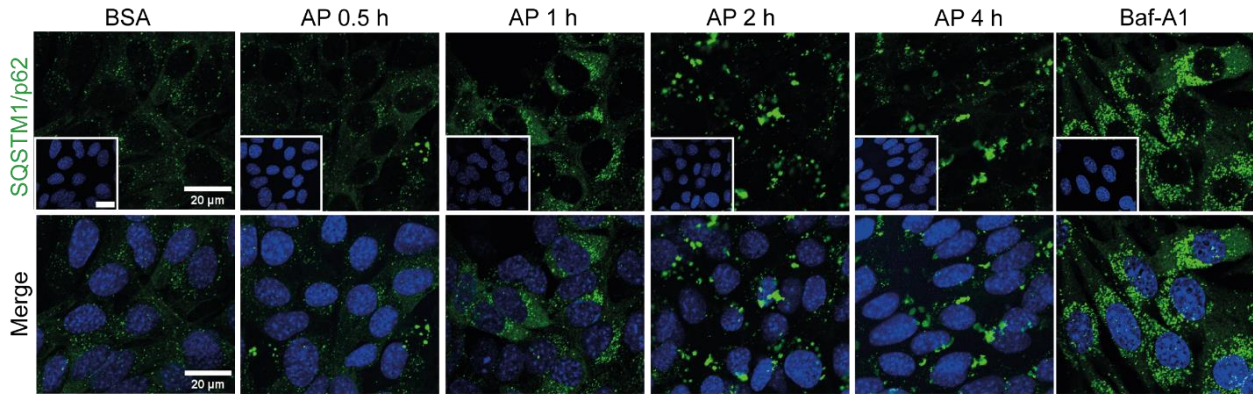
(B)



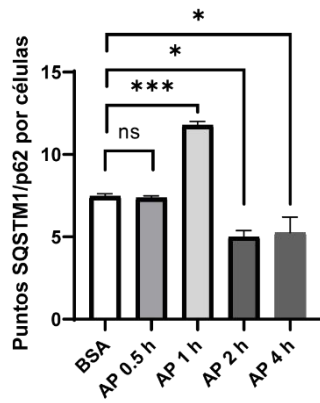
(C)



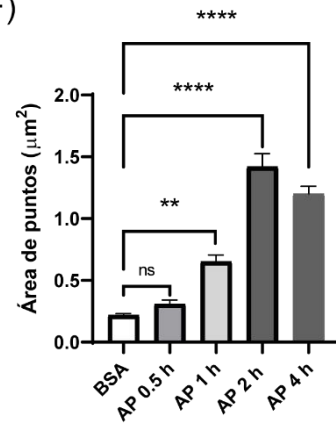
(D)



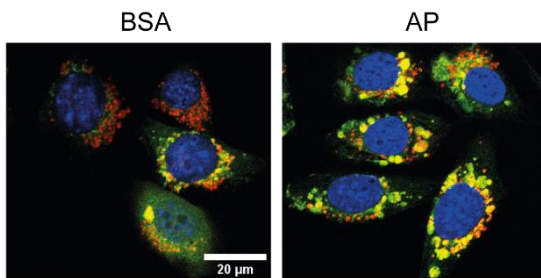
(E)



(F)



(G)



LC3-GFP-mCherry

(H)

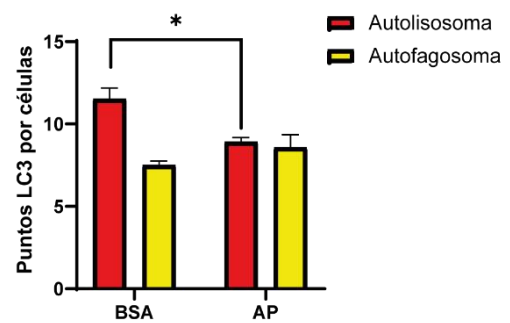


Figura 7. El AP inhibe el flujo autofágico en células N43/5

(A) Células N43/5 fueron sembradas y tratadas con AP 100 μ M durante 1, 2 y 4 h. BSA (vehículo) fue usado como control. Luego, las células fueron fijadas en PFA 4%, y la presencia de cilio primario fue evaluado por inmunofluorescencia de Tubulina Acetilada (Tub. Ac.) con un anticuerpo específico. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal, y fotos representativas son mostradas (n=3). Escala = 10 μ m. La cuantificación del tamaño ciliar y porcentaje de células ciliadas fueron evaluadas y los valores representados en (B) y (C), respectivamente. (D) Células N43/5 fueron sembradas y tratadas con AP 100 μ M durante 0.5, 1, 2 y 4 h. BSA (vehículo) fue usado como control. Luego, las células fueron fijadas en PFA 4% y posteriormente la acumulación de SQSTM1/p62 fue evaluada por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. Las muestras fueron adquiridas por microscopía confocal y fotos representativas son mostradas, (n=3). Escala = 20 μ m. Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 1 μ g/mL. La cuantificación del número y área de los puntos SQSTM1/p62 fueron evaluadas y representadas en (E) y (F), respectivamente. (G) Células N43/5 LC3-GFP-mCherry fueron tratadas con AP 100 μ M por 2 h. BSA (vehículo) fue usado como control. Los puntos fluorescentes rojos (autolisosomas) y amarillos (autofagosomas) fueron cuantificados con el programa ImageJ y luego representados en el gráfico (H). Escala = 20 μ m. Los valores presentan el promedio \pm SEM, n=3 y fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías, seguido por un ensayo Bonferroni post hoc. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001.

La pérdida del cilio mediada por AP inhibe la autofagia en neuronas POMC.

Para estudiar si el efecto del AP en la inhibición autofágica depende de la presencia del cilio primario, se construyó una línea celular deficiente del gen *cep164* (N43/5 *cep164*^{-/-}), lo cual generó células sin cilio primario (**Figura 8A-B**). De este modo, observamos que, respecto a la línea silvestre (WT), la línea N43/5 *cep164*^{-/-} presenta un mayor número de puntos SQSTM1/p62, así como un aumento en el área de estos (**Figura 8C-D**). Este fenotipo fue similar a lo que se observa en células N43/5 WT tratadas con el inhibidor de flujo autofágico, Baf-A1 (**Figura 8B-C**). Por lo tanto, nuestros resultados mostraron que el cilio primario es necesario para la autofagia en células N43/5. Esta observación fue consistente cuando se evaluó el flujo autofágico en células N43/5 LC3-GFP-mCherry transfectadas con un siRNA específico contra IFT88 (siIFT88), lo cual genera células carentes de cilio primario (**Figura 8F**). En efecto, células N43/5 WT transfectadas con el siRNA para IFT88 (siIFT88) mostraron una significativa disminución en la ciliogénesis respecto a células transfectadas con un siRNA control (siControl) (**Figura 8G**). En esas condiciones, para evaluar el requerimiento del cilio en la inducción de

autofagia, se utilizó Rapamicina (Rapa) a 1 μ M como control positivo de autofagia (**Figura 8H**). De esta forma, nuestros experimentos mostraron que el aumento de autolisosomas inducido por rapamicina, disminuyó significativamente en células transfectadas con un siIFT88. Por lo tanto, nuestros datos confirman que el cilio primario es necesario para la autofagia en células N43/5.

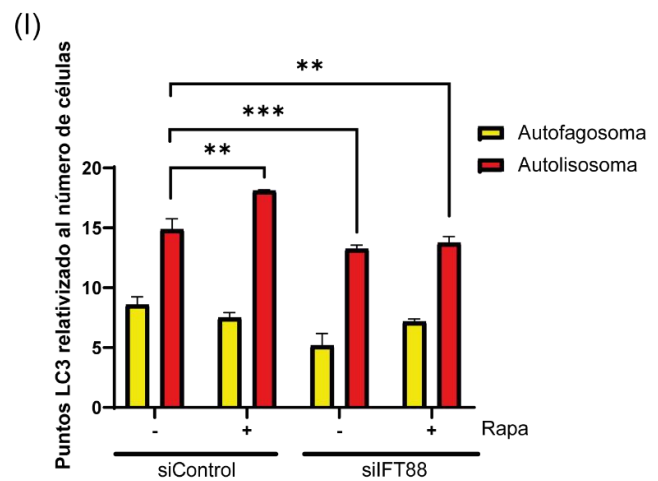
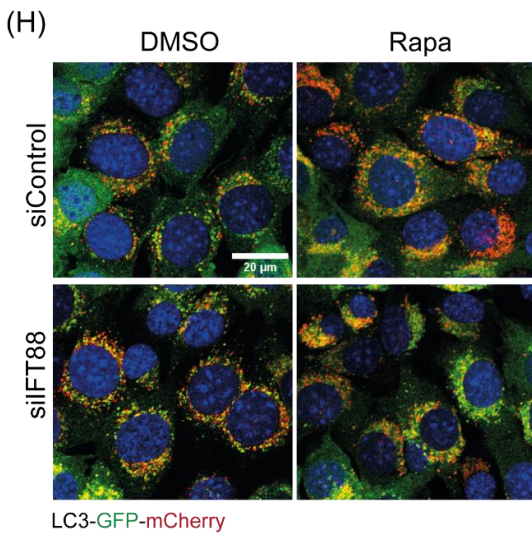
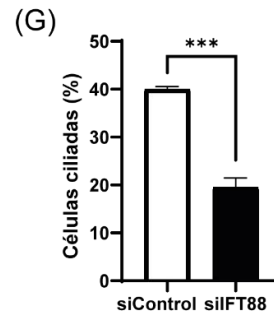
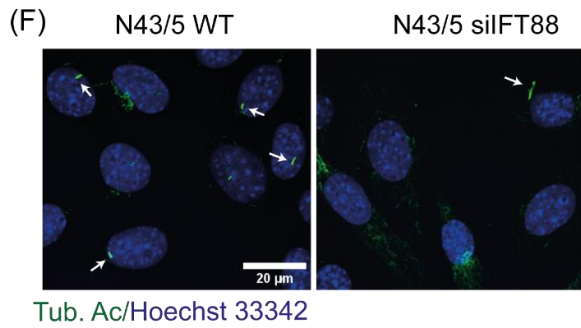
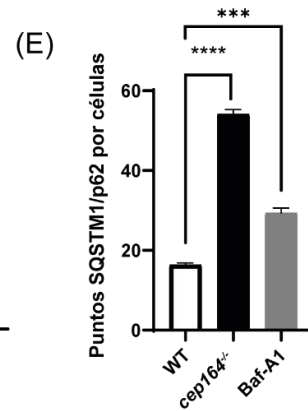
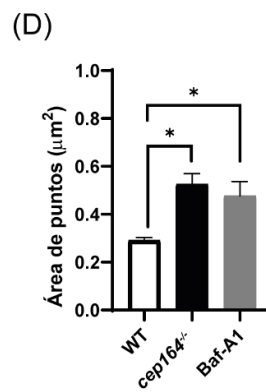
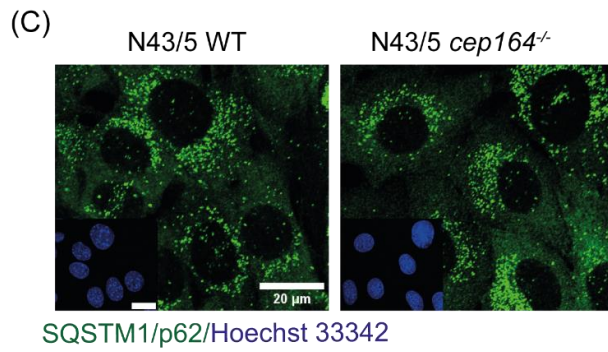
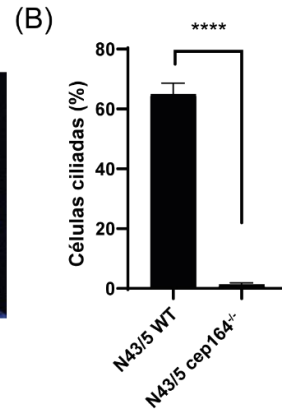
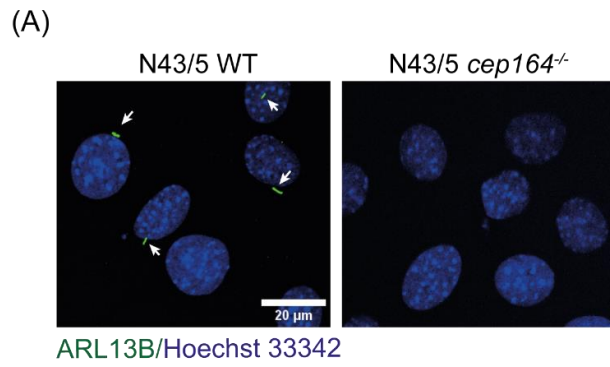


Figura 8. El cilio primario es necesario para la inducción de autofagia en células N43/5.

(A-B) Células N43/5 WT y N43/5 *cep164*^{-/-} deficientes de cilio primario, fueron sembradas y fijadas en 4% PFA. Posteriormente, el cilio primario fue estudiado por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra ARL13B y los núcleos teñidos con Hoechst 33342 1 µg/mL. Las muestras fueron evaluadas por microscopía confocal e imágenes representativas son mostradas en (A). Escala = 20 µm. Los valores de la cuantificación del porcentaje de células ciliadas se presentan en (B). Células N43/5 WT y N43/5 *cep164*^{-/-} fueron procesados como en (A) y posteriormente SQSTM1/p62 fue evaluado por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. Escala = 20 µm. Imágenes representativas son mostradas en (C) y los valores de la cuantificación del número y área de puntos de SQSTM1/p62 son mostrados en (D) y (E), respectivamente. (F-G) Células N43/5 fueron transfectadas con un siRNA contra IFT88 (siIFT88) o un siRNA control (siControl) durante 48 h. Luego, el cilio primario fue evaluado por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra Tubulina acetilada (Tub.Ac). Escala = 20 µm. Imágenes representativas son mostradas en (F) y la cuantificación del porcentaje de células ciliadas es presentada en (G). (H-I) Células LC3-GFP-mCherry fueron transfectadas con un siRNA contra IFT88 (siIFT88) o un siRNA control (siControl) durante 48 h. Luego, las células fueron tratadas con rapamicina (Rapa) 1 µM durante 1 hora. Las células fueron fijadas y posteriormente evaluadas por microscopía de fluorescencia. Escala = 20 µm. Imágenes representativas son mostradas en (H) y la cuantificación de autofagosomas (puntos amarillos) y autolisosomas (puntos rojos) son mostradas en (I). Los datos representan el promedio ± SEM y fueron analizados utilizando t-test de dos colas o ANOVA de una o dos vías, seguido por un ensayo Bonferroni post hoc, según corresponda. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. n=3.

Para validar que el efecto del AP está condicionado por la presencia del cilio primario, se llevó a cabo el silenciamiento de MAP4 (**Figura 9A-B**) con el objetivo de inducir ciliogénesis y evitar la pérdida o reducción del tamaño del cilio durante el tratamiento con AP (**Figura 9C-D**). Para esto, se procedió a analizar el número y área de puntos de SQSTM1/p62 en distintos tiempos de tratamiento con AP al realizar la inducción de ciliogénesis mediada por el silenciamiento de MAP4 (**Figura 9E**). Como muestran nuestros resultados, durante la condición siMAP4, tanto el número como el área de puntos de SQSTM1/p62 disminuye significativamente en comparación con la condición de control después de una hora de exposición a AP (**Figura 9G-F**). Por lo tanto, nuestros datos muestran que la inducción de la ciliogénesis previene el bloqueo del flujo autofágico inducido por AP.

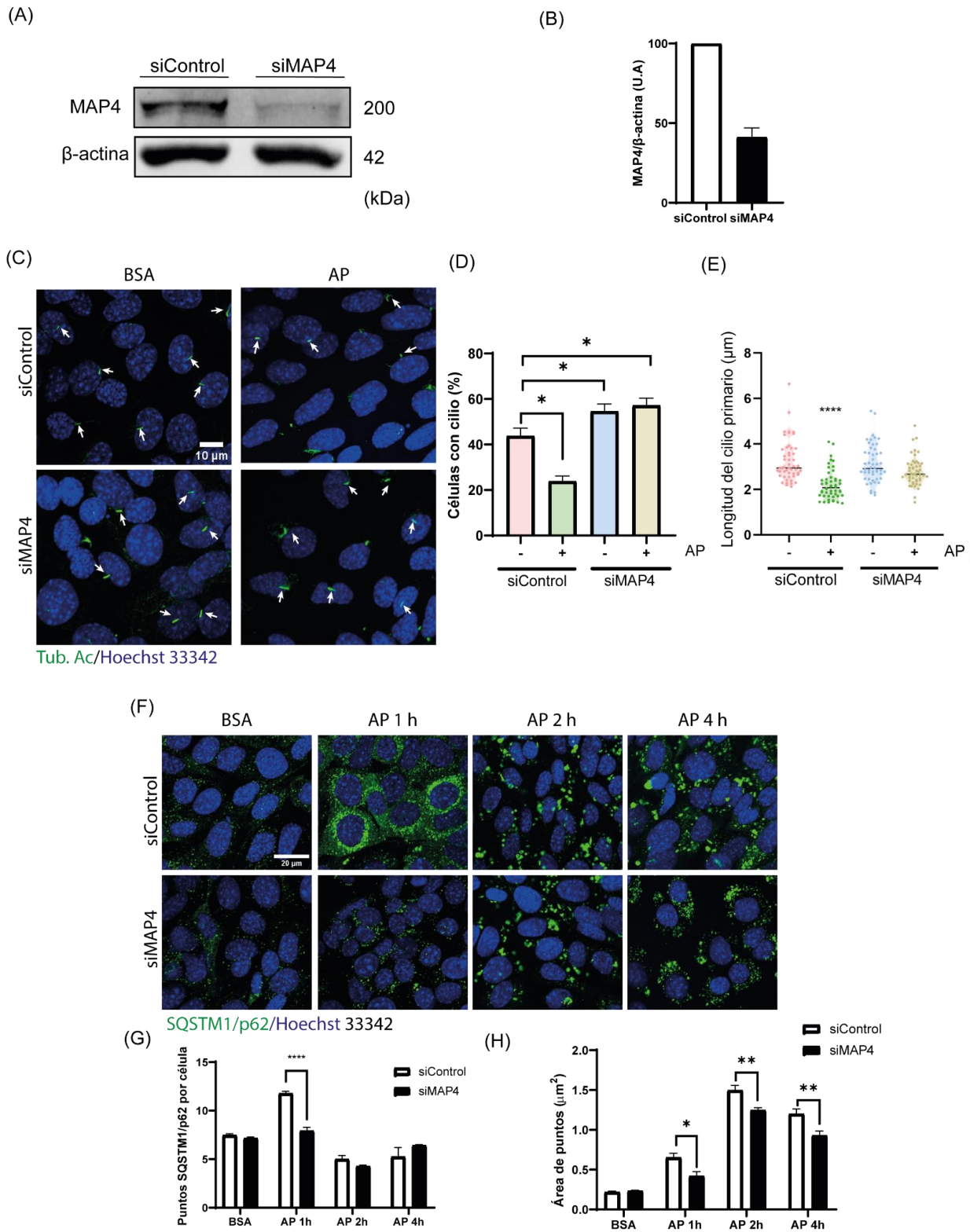


Figura 9. La inducción de ciliogénesis previene el bloqueo de autofagia inducido por AP.

(A-B) Células N43/5 fueron sembradas y transfectadas durante 48 h con un siRNA específico para MAP4 (siMAP4) o un siRNA no relacionado como control (siControl). Posteriormente, extractos proteicos fueron preparados y los niveles de MAP4 fueron analizados por Western Blot. Los geles representativos son mostrados en (A) y la cuantificación de los geles son mostrados en (B). Los valores representan el promedio \pm SEM (n=2). $p=0,0096$. (C) MAP4 fue silenciado en células N43/5 como se describe en (A). Luego, las células fueron tratadas con AP 100 μ M o BSA (vehículo) durante 4 h. Posteriormente, las células fueron fijadas en PFA 4% y la presencia del cilio primario analizada por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra Tubulina Acetilada (Tub. Ac). Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 1 μ g/mL. Las muestras se adquirieron mediante microscopía confocal y fotos representativas son mostradas en (C) (n=3). Escala = 10 μ m. La cuantificación del porcentaje de células ciliadas y longitud del cilio, son representados en (D) y (E), respectivamente. (F-H) MAP4 fue silenciado en células N43/5 como se describe en (A) y luego tratadas con AP 100 μ M durante 1, 2 y 4 h. BSA (vehículo) fue usado como control. Subsecuentemente, el flujo autofágico fue evaluado mediante inmunofluorescencia de SQSTM1/p62 y la cuantificación del número y área de puntos de SQSTM1/p62 son representados en los gráficos (G) y (H), respectivamente. Escala = 20 μ m. Los valores muestran el promedio \pm SEM, los cuales fueron analizados mediante ANOVA de una o dos vías, seguido por un ensayo Bonferroni post hoc, según corresponda. * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$, n=3.

El cilio primario es necesario para la formación del complejo PKD2-BECN1.

Para determinar que la formación del complejo PKD2-BECN1 depende de la presencia del cilio primario, se realizó una co-inmunoprecipitación de PKD2 y BECN1 a partir de extractos proteicos aislados de células N43/5 WT y N43/5 *cep164*^{-/-}, las cuales, como se mostró anteriormente, carecen del cilio primario (**Figura 8A-B**). Nuestros resultados mostraron que PKD2 y BECN1 co-inmunoprecipitan en células N43/5 WT, sin embargo, esta co-inmunoprecipitación no fue observada en células N43/5 *cep164*^{-/-} (**Figura 10A-B**). Este hallazgo se complementó con ensayos de PLA, el cual a través de técnicas de microscopía permite evaluar la cercanía entre dos proteínas (~ 40 nm), observándose como puntos fluorescentes (**Figura 10C**). Al cuantificar las reacciones de PLA, fue posible evidenciar una reducción significativa en el número de reacciones de PLA en células N43/5 *cep164*^{-/-}, respecto a las células N43/5 WT. En su conjunto, nuestros resultados indican que el cilio primario es necesario para la formación del complejo PKD2-BECN1.

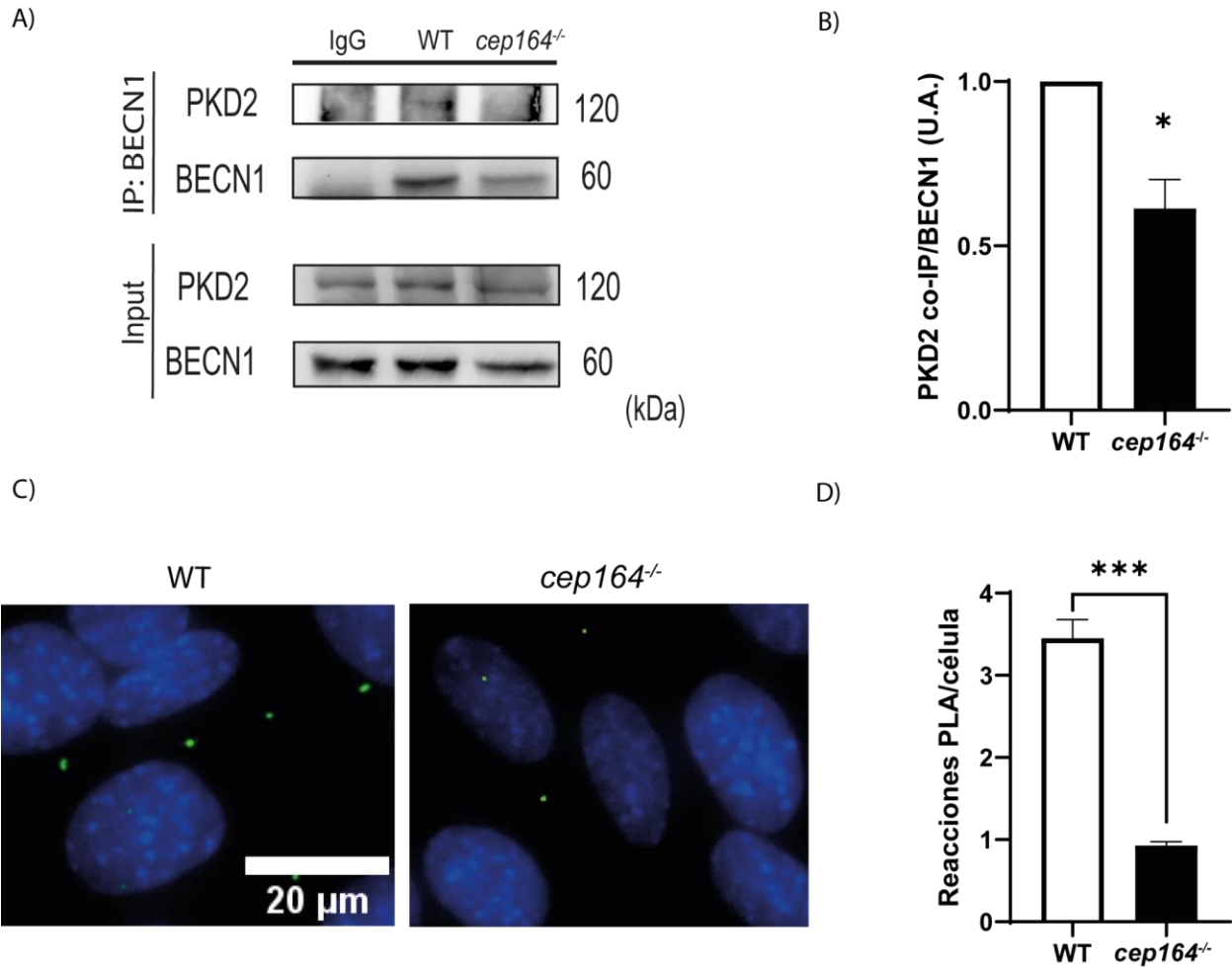


Figura 10. El cilio primario es necesario para la formación del complejo PKD2-BECN1.

(A) Células N43/5 WT y N43/5 *cep164*^{-/-} fueron sembradas a una confluencia del 70-80%. Luego, se prepararon extractos proteicos totales y BECN1 fue inmunoprecipitada con anticuerpos específicos. Un anticuerpo no relacionado (IgG) fue usado como control. Posteriormente, la co-inmunoprecipitación de BECN1 y PKD2 fue evaluada por Western Blot. Los geles representativos son mostrados en (A) y la cuantificación de estos son representados en el gráfico en (B). Los valores muestran el promedio \pm SEM y analizados por *t*-test de dos colas. * p <0.05, n =3. (C-D) Células N43/5 WT y N43/5 *cep164*^{-/-} fueron sembradas a una confluencia del 70-80% y luego se realizó un ensayo de ensayo de ligación por proximidad (PLA) para estudiar la cercanía entre BECN1 y PKD2. Cada punto fluorescente corresponde a una reacción positiva de PLA, los cuales fueron evaluados con un microscopio CellObserver, equipado con una cámara ultrasensible EMCCD Evolve 512 delta, y analizadas con Icy. Las imágenes representativas se muestran en (C). Escala = 20 μ m. La cuantificación de reacciones PLA fueron normalizadas respecto al número de células y representados en el gráfico (D). Los valores muestran el promedio \pm SEM y analizados por *t*-test de dos colas. * p <0.05, *** p <0.001, n =3.

AP disocia el complejo proteico PKD2-BECN1.

A continuación, para evaluar el efecto del AP sobre la formación del complejo proteico PKD2-BECN1, se realizó una co-inmunoprecipitación a partir de extractos de células N43/5 WT tratadas con o sin 100 μM de AP durante 2 h. Los resultados de estos experimentos mostraron una disminución significativa en la co-inmunoprecipitación de PKD2 y BECN1 cuando las células fueron tratadas con AP, respecto a la condición control con BSA (vehículo) (**Figura 11A-B**). Estos resultados fueron complementados con el ensayo PLA, donde se confirmó que el tratamiento con AP disminuye el número de reacciones de PLA (**Figura 11C-D**). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el tratamiento con AP induce una disociación del complejo PKD2-BECN1 en células N43/5.

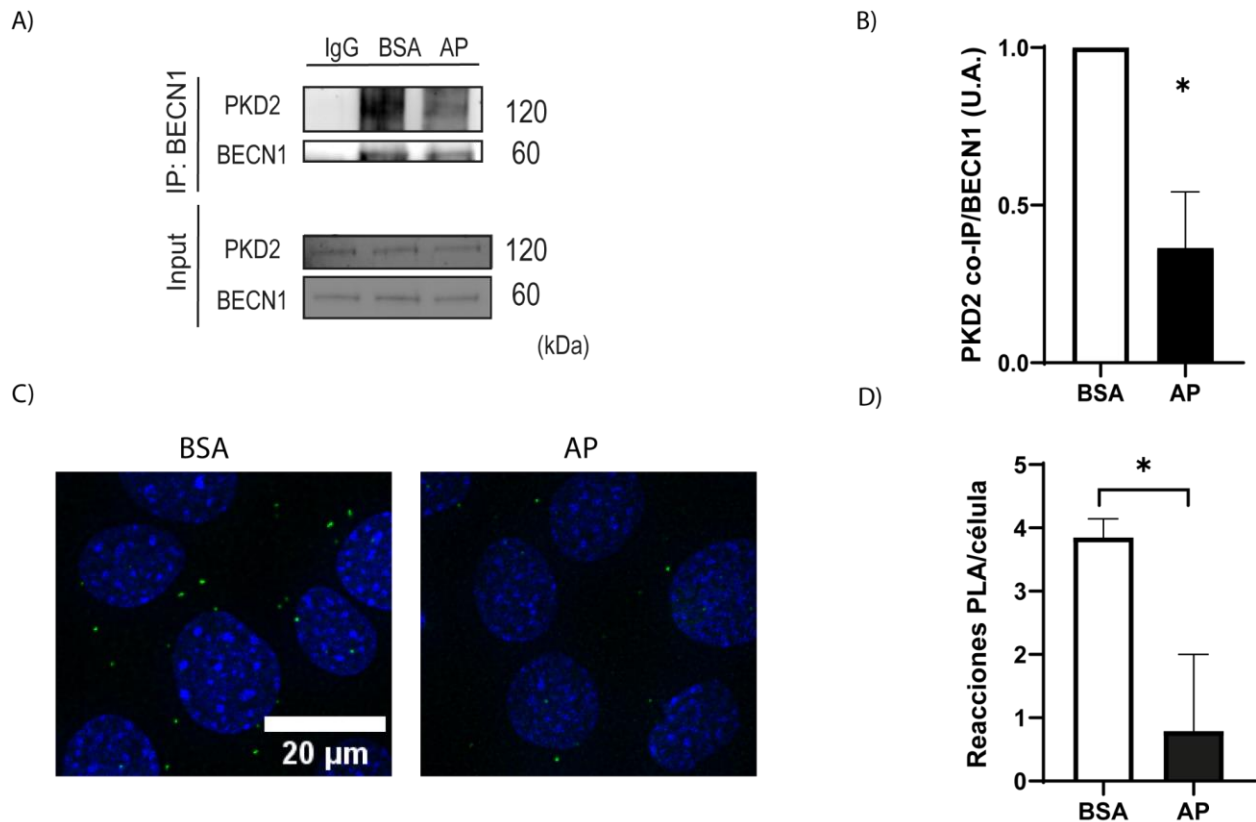


Figura 11. AP disocia el complejo PKD2-BECN1.

(A-B) Células N43/5 fueron sembradas hasta una confluencia del 70-80% y luego se trataron con AP 100 μM durante 2 h. BSA (vehículo) fue usado como control. Posteriormente, se inmunoprecipitó BECN1 y la membrana se reveló contra PKD2. Un anticuerpo no relacionado (IgG) fue usado como control. Geles representativos son mostrados en

(A) y la cuantificación de estos es representada como promedio \pm SEM (n=3) en (B). Células N43/5 fueron sembradas y tratadas con AP como se explica en (A) y luego fijadas en PFA 4%. Posteriormente se realizó un ensayo de PLA para BECN1 y PKD2 donde cada punto corresponde a una señal positiva de cercanía para ambas proteínas igual o menor a 40 nm. Imágenes representativas obtenidas en un microscopio CellObserver equipada con una cámara ultrasensible EMCCD Evolve 512 delta y analizadas con Icy son mostradas en (C) y la cuantificación de reacciones de PLA respecto al número de células es representada en (D). Escala = 20 μ m. Los valores muestran el promedio \pm SEM, los cuales fueron analizados por una prueba t-test de dos colas, *p<0.05, n=3.

PKD2 es necesario para la activación de autofagia

Con el propósito de evaluar si el complejo PKD2-BECN1 es necesario para la activación de la autofagia, se utilizó la línea celular N43/5 *pkd2*^{-/-} previamente descrita. Posteriormente, se evaluó por inmunofluorescencia la proteína SQSTM1/p62 para la determinación del flujo autofágico. Así, nuestros resultados revelaron una disminución en el número de puntos SQSTM1/p62 en la línea N43/5 *pkd2*^{-/-} respecto a la línea N43/5 WT (**Figura 12A-B**). Además, se muestra una acumulación de SQSTM1/p62 al aumentar el área de estos en las células N43/5 *pkd2*^{-/-} (**Figura 12C**). En conjunto, la falta de PKD2 por sí misma provoca una inhibición en el flujo autofágico al disminuir el número de puntos de SQSTM1/p62.

Para fortalecer los resultados anteriores, usamos la línea celular N43/5 LC3-GFP-mCherry, la cual fue transfectada con un siRNA específico para PKD2 (siPKD2) o un siRNA control (siControl). Posteriormente, se analizó el flujo autofágico por medio del conteo de autofagosomas (puntos fluorescentes amarillos) y autolisosomas (puntos fluorescentes rojos). Nuestros resultados mostraron una disminución significativa de autolisosomas en células N43/5 LC3-GFP-mCherry transfectadas con el siPKD2 (**Figura 12D-E**). En conclusión, nuestros datos comprueban que la proteína PKD2 es necesaria para la autofagia en células N43/5.

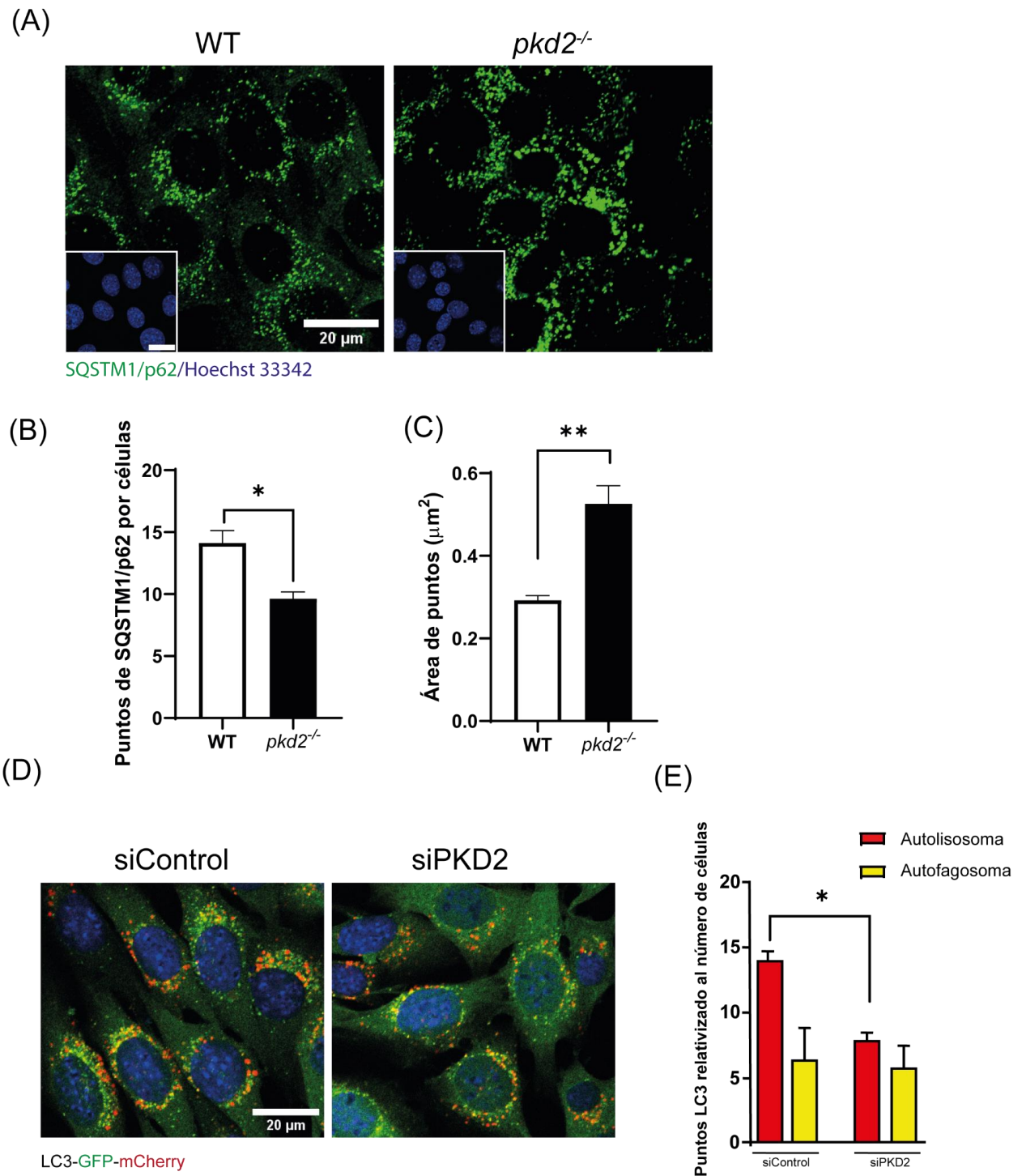


Figura 12. PKD2 es necesario para la activación de la autofagia en células N43/5.

(A-C) Células N43/5 WT y N43/5 *pkd2*^{-/-} fueron sembradas y tratadas con AP 100 μ M durante 2 h. BSA (vehículo) fue usado como control. Luego, las células fueron fijadas en PFA 4% y posteriormente la acumulación de SQSTM1/p62 fue evaluada por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. Las muestras fueron estudiadas por microscopía confocal y las fotos representativas son mostradas en **(A)** (n=3). Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 1 μ g/mL. Las cuantificaciones del número y área de los puntos SQSTM1/p62 son representados en los gráficos **(B)** y **(C)**, respectivamente. Escala = 20 μ m **(D-E)** Células N43/5 LC3-GFP-mCherry fueron sembradas y transfectadas durante 24 h con un siRNA específico para PKD2 (siPKD2) o un siRNA no relacionado como control (siControl). Luego, las células fueron tratadas con AP 100 μ M por 2 h. BSA (vehículo) fue usado como control. A continuación, las células fueron fijadas con PFA 4% y las muestras estudiadas mediante microscopía confocal. Las imágenes representativas son mostradas en **(D)**. Escala = 20 μ m. Los puntos fluorescentes rojos (autolisosomas) y amarillos (autofagosomas) fueron cuantificados con el programa ImageJ y luego representados en el gráfico **(E)**. Los valores representan el promedio \pm SEM, n=3 y fueron analizados utilizando ANOVA de uno o dos vías, seguido por un ensayo Bonferroni post hoc, según corresponda. *p<0.05, **p<0.01.

Discusión

PKD2 y BECN1 como moduladores de la autofagia.

Diversos estudios han dado cuenta de la presencia de proteínas de la maquinaria autofágica en el cilio primario, tales como LKB1, AMPK y LC3 (Mick et al., 2015; Pampliega et al., 2013). Lo que ha llevado a investigar los mecanismos que regulan la interacción entre la autofagia y el este organelo (Morleo et al., 2023). Recientemente, se ha asociado también a la proteína PKD2 en la regulación de la autofagia (Peña-Oyarzun et al., 2020), la cual se encuentra enriquecida en el cilio primario (X. Liu et al., 2018), y cuya función ha sido clave para entender el desarrollo de la poliquistosis renal autosómica dominante (de sus siglas en inglés, ADPKD), causada por mutación en los genes de *PKD1* o *PKD2* (Harris & Torres, 2009). En este contexto, se ha demostrado que el uso de un activador autofágico como la rapamicina disminuye la formación de quistes (Zhu et al., 2017), lo que sugiere una relación entre la autofagia y esta enfermedad. Lo anterior se ve reforzado con diferentes estudios que demuestran que PKD2 es necesario para inducir autofagia en diferentes tipos celulares tales como cardiomiocitos, células del conducto colector medular interno de ratón, células HeLa y una línea celular de cáncer de colon humano (Criollo et al., 2018; Decuyper et al., 2021; Peña-Oyarzun et al., 2017). Por lo tanto, existe una amplia evidencia que asocia la presencia de PKD2 con la inducción de autofagia.

La autofagia es un proceso de degradación de proteínas intracelulares, el cual tiene como actor central a mTORC1 (Grace Y. Liu et al., 2020), existiendo una amplia evidencia que relaciona al cilio primario y a este complejo proteico (Lai & Jiang, 2020). Por ejemplo, LKB1 es una quinasa que ha sido encontrada en el cilio primario de células epiteliales pigmentarias de la retina (Mick et al., 2015), la cual fosforila a AMPK, lo que conduce a la inhibición de mTORC1, promoviendo la autofagia (Orhon et al., 2016). Como se mencionó anteriormente, en ADPKD la inhibición de mTORC1 con rapamicina disminuye la formación de quistes (Zhu et al., 2017). Por lo tanto, para responder porqué la inhibición de mTORC1 es beneficiosa como tratamiento de ADPKD, es que se debe comprender lo que está ocurriendo en situaciones basales. Otros estudios han demostrado que el estrés de flujo aumenta los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos a través del complejo PKD1-PKD2 (Nauli et al., 2003). El incremento de este segundo mensajero conlleva a la inhibición de la Adenilato Ciclasa (AC) (Cooper et al., 1994), en particular AC3 (Wayman et al., 1995), la cual se

encuentra enriquecida en el cilio primario (Bishop et al., 2007), y cuya inhibición disminuye los niveles de AMP cíclico (cAMP) (Duffy et al., 2021). Por el contrario, cuando se pierde la actividad de PKD1 o PKD2, los niveles de Ca^{2+} disminuyen (Nauli et al., 2003), por lo tanto, aumentan los niveles de cAMP, lo cual ha sido ampliamente reportado en distintos modelos de ADPKD (Torres & Harris, 2014). Así, se sugiere que al aumentar los niveles de cAMP, se activa la proteína quinasa A (PKA), la cual se encuentra en el cuerpo basal del cilio primario (Tuson et al., 2011), aumentando la actividad de mTORC1 (Jewell et al., 2019). Por lo tanto, la inhibición de mTORC1 con rapamicina, podría contrarrestar los efectos causados por la deficiencia de PKD1 o PKD2.

Recientemente, nuestro laboratorio ha mostrado que PKD2 forma un complejo proteico con BECN1 en células HeLa, modelo en el cual la presencia del cilio primario ha sido controversial (Kowal & Falk, 2015; Peña-Oyarzun et al., 2021). Hasta la fecha, no existen antecedentes sobre la formación de este complejo en el cilio primario de células N43/5, ni de si este complejo modula la autofagia. La presente investigación da cuenta por primera vez de la presencia de BECN1 en el cilio primario de células hipotalámicas N43/5 (**Figura 7**), sugiriendo además la formación del complejo PKD2-BECN1 en este organelo (**Figura 10**). A pesar de lo anterior, resultaría interesante estudiar si el complejo PKD2-BECN1 se encuentra en cilio primario de otras líneas celulares, pudiendo modular de este modo también la autofagia.

BECN1 es una proteína que forma parte del complejo PI3KCIII, un complejo proteico que se relaciona con la autofagia y el tráfico endosomal (Safaroghli-Azar et al., 2023). Este complejo se compone por tres proteínas centrales (Vsp34, Vsp15 y BECN1), las cuales se pueden asociar tanto a Atg14L (PI3KCIII-C1), como UVRAG (PI3KCIII-C2) (Itakura et al., 2008; Itakura & Mizushima, 2009). Por lo tanto, la función de PI3KCIII dependerá de los complejos proteicos del cual forme parte. En el caso de PI3KCIII-C1, la fosforilación de BECN1 inicia la formación del autofagosoma (Park et al., 2018). Mientras que BECN1 perteneciente a PI3KCIII-C2 tiene un rol en el tráfico endosomal (McKnight et al., 2014; S. Tran et al., 2024) y la maduración autofagosomal (C. Liang et al., 2008), este último se refiere al proceso de transporte del autofagosoma y su fusión con el lisosoma (Y. G. Zhao et al., 2021).

En todas estas situaciones, las modificaciones post-traduccionales de BECN1 regulan la actividad de los diferentes complejos PI3KCIII (Hill et al., 2019). Hasta la fecha se han descrito quince fosforilaciones en BECN1, las cuales han mostrado tener un impacto sobre la autofagia (Menon & Dhamija, 2018). Como se mencionó anteriormente, la inhibición de mTOR conlleva a la activación de ULK1, el cual posteriormente fosforila a BECN1 en S14 y S30 dentro del complejo PI3KCIII-C1, lo que se traduce en el reclutamiento de PI3KCIII-C1 al fagoforo. En caso contrario, cuando en BECN1 se mutan los sitios S14 o S30 por alanina, el número de autofagosomas disminuye significativamente (Park et al., 2018; Russell et al., 2013). Más aún, BECN1 puede ser acetilado por la proteína p300, lo cual induce la interacción de BECN1 con Rubicon, un inhibidor autofágico, produciéndose una inhibición en la maduración del autofosoma (Sun et al., 2015). Por otra parte, estudios han demostrado que ratones deficientes de PI3KCIII desarrollan glomeruloesclerosis, observándose una acumulación de LC3-II y SQSTM1/p62, sin formación de autolisosomas (Bechtel et al., 2013). En su conjunto, BECN1 muestra tener un interactoma múltiple en donde su función dependerá de su interacción con distintas proteínas, así como de las modificaciones post-traduccionales que esten presentes. Del mismo modo, se ha reportado que el complejo PKD2-BECN1 co-inmunoprecipita con proteínas que forman parte de PI3KCIII, como Rubicon y ATG14L (Peña-Oyarzun et al., 2021).

En la presente investigación, se observa que el tratamiento con AP disminuye significativamente la formación del complejo PKD2-BECN1 (**Figura 10**), observándose una disminución significativa en el número de autolisosomas (**Figura 7**). Sin embargo, en estas condiciones las células no pierden la capacidad de formar autofagosomas (**Figura 7**). Estos resultados fueron consistentes por aquellos observados por Hernández-Cáceres et al., 2020, donde el tratamiento con AP a células N43/5 reduce la fusión entre el autofosoma con el lisosoma (Hernández-Cáceres et al., 2020). Por lo tanto, nuestros resultados y los de la literatura, dan cuenta de un defecto del AP sobre el proceso de maduración autofagosomal.

Diferentes estudios que vinculan la función de PKD2 sobre la autofagia, han mostrado que la regulación negativa de PKD2 reduce la actividad autofágica aumentando la actividad de mTORC1 (Orhon et al., 2016; Peña-Oyarzun et al., 2017). Sin embargo, estudios muestran que si bien la sobreexpresión de PKD2 aumenta la autofagia, esto no modula la actividad de mTORC1

(Lu et al., 2018), sugiriendo que el papel del complejo PKD2-BECN1 sobre la autofagia es independiente de mTORC1. Así, una vía alternativa podría ser dependiente del tráfico endosomal, ya que para que los autofagosomas se fusionen con los lisosomas, es necesario una regulación por parte de las proteínas GTPasas Rab (Sørensen et al., 2018).

En breve, la membrana autofagosomal puede provenir de diversos organelos como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi (Bieber et al., 2022). Rab1 es una proteína que controla el tráfico anterógrado desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi de endosomas tempranos, y en condiciones de privación de nutrientes, Rab1 co-localiza con LC3. Más aún, mientras que la sobreexpresión de Rab1 promueve la formación de autofagosomas, su ausencia induce una disminución significativa en la formación de estos (Mukhopadhyay et al., 2011). Por otro lado, se ha demostrado que Rab5 es necesaria para la nucleación del autofagosoma (Zhou et al., 2017, 2019), el cual se une a PI3KCIII-C2 (Christoforidis et al., 1999) induciendo su activación. Lo mismo sucede con Rab1, el cual interactúa con PI3KCIII-C1, activándolo (Tremel et al., 2021). Interesantemente, la delección de BECN1 en neuronas hipocámpales, reduce significativamente la formación de endosomas tempranos dependientes de Rab5 (McKnight et al., 2014). Por otra parte, la delección de BECN1 en células epiteliales intestinales, genera una disminución significativa de Rab5, afectando la formación de endosomas tempranos (S. Tran et al., 2024). Durante el proceso de maduración de los endosomas, la cantidad de Rab5 disminuye mientras que la de Rab7 aumenta. Esta última permite la fusión de los endosomas con los lisosomas (Borchers et al., 2021). Aunque no existen estudios que confirmen un cambio similar en los niveles de proteínas en los autofagosomas entre Rab5 y Rab7, sí se sabe que Rab7 está presente en ellos. Cuando Rab7 se activa en los autofagosomas, pueden formarse los autolisosomas (Guerra & Bucci, 2016). Por lo tanto, la acción de BECN1 en la vía endosomal demuestra activar una cascada que culmina en la maduración autofagosomal.

Lo anterior demuestra que la autofagia es un proceso altamente coordinado, el cual dependería de otras maquinarias, como la endosomal (Ao et al., 2014). De este modo, BECN1 estaría cumpliendo un rol integrador entre ambas vías, por lo que se sugiere que la inhibición de autofagia inducida por AP (**Figura 7**) se debe a un efecto sobre la vía endosomal el cual contiene al complejo PKD2-BECN1. Por lo tanto, como proyección hacia futuros estudios, se debería

iniciar el estudio de las señales de destinación ciliar de BECN1, lo que permitirá generar modelos deficientes de esta proteína, y analizar si este complejo tiene una vía de señalización dependiente o no de mTORC1.

AP como actor en la inhibición de la autofagia y la ciliogénesis en neuronas hipotalámicas.

Por otro lado, el AP es un ácido graso saturado que se acumula en el hipotálamo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa (Morselli et al., 2014; Vagena et al., 2019), y diversos estudios han dado cuenta del efecto inhibitorio que tienen estos ácidos grasos sobre la autofagia en células hipotalámicas (Meng & Cai, 2011; Portovedo et al., 2015; Reginato et al., 2016). El AP puede difundir a través de la membrana plasmática, sin embargo, también puede activar receptores del tipo *Toll* como TLR2 (Senn, 2006), TLR4 (Nicholas et al., 2017). Del mismo modo, nuestro grupo evidenció previamente que AP puede activar FFAR1 (de sus siglas en inglés, *Free Fatty Acid Receptor 1*), siendo este receptor crítico en el bloqueo de la autofagia inducido por AP en neuronas N43/5 (Hernández-Cáceres et al., 2019). FFAR1 también es conocida como GPR40 (de sus siglas en inglés, *G protein-coupled receptor 40*), la cual está acoplada a la proteína $G_{\alpha q}$ (Bharate et al., 2009), localizándose en la membrana plasmática, mas no en la membrana del cilio primario (Salehi et al., 2005; Wu et al., 2021). Así, estudios han mostrado que en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer, la administración de un agonista para GPR40 (GW9508), inhibe la autofagia en células hipocámpales (Wang et al., 2024). Además, estudios *in vitro*, en una línea celular β pancreática, revelaron que agonistas de GPR40 (Vincamina), aumentaron significativamente los niveles de cAMP (Du et al., 2019), lo cual es una respuesta similar a la observada en modelos de ADPKD (Torres & Harris, 2014).

En línea con los antecedentes anteriores, se pudo determinar que AP inhibe la ciliogénesis en células N43/5 al observarse una disminución en el porcentaje de células ciliadas, así como un acortamiento en el largo del cilio primario a partir de las 2 h de tratamiento (**Figura 7A-C**). Por lo tanto, el uso de ácidos grasos saturados, como AP, resulta de gran interés por que permite entender la intercomunicación entre el cilio primario y la autofagia. Es interesante notar que una modificación post-traduccional en la ciliogénesis necesaria para la estabilización de microtúbulos es la acetilación de la α -tubulina en el residuo K40 (Akella et al., 2010). Más aún, estudios han

mostrado que la acetilación de tubulina permite su interacción con regiones ricas en ceramida de la membrana ciliar cuando se encuentra S-palmitoilada, generando la estabilización del cilio primario (Tripathi et al., 2021). A pesar de lo anterior, el efecto del AP en temporalidades largas disminuye el tamaño ciliar, generando lipotoxicidad en diferentes modelos celulares (Al Saedi et al., 2019; Ávalos et al., 2022; Nissar et al., 2015). Por otra parte, se ha demostrado en microglías y células β -pancreáticas que el uso de ácidos grasos insaturados o polinsaturados revierte la lipotoxicidad producida por AP (W. Liu et al., 2024; Urso & Zhou, 2021). Además, en una línea celular de osteosarcoma, se demostró que el ácido oleico es capaz de inducir autofagia de una vía que no depende de PI3KCIII ni de BECN1 (Niso-Santano et al., 2015). Más aún, el ácido oleico, un ácido graso insaturado, restaura el flujo autofágico de neuronas hipotalámicas tratadas con AP (He W et al., 2022). Por lo tanto, futuros estudios deberían dar cuenta de la función de los ácidos grasos insaturados sobre la formación del complejo PKD2-BECN1, y si es posible la mantención del complejo cuando se realiza un co-tratamiento con AP.

En la línea celular N43/5 se pudo observar una inhibición de la autofagia después del tratamiento con AP durante 1 hora, generando una distribución de puntos de SQSTM1/p62 similar a la observada tras el uso con Baf-A1 (**Figura 7D-F**). Sin embargo, en tiempos prolongados, se puede observar la formación de puntos de gran área, conocidos como cuerpos de inclusión, los cuales se pueden encontrar en vesículas neutrales o acídicas (Pankiv et al., 2007). SQSTM1/p62 es una proteína que, a través de su dominio UBA, selecciona los sustratos cargo que serán degradados mediante la autofagia (Katsuragi et al., 2015). Por lo tanto, el patrón de distribución citoplasmático de SQSTM1/p62 puede significar la acumulación de sustratos dentro de las vesículas autofágicas las cuales no han podido ser degradadas, lo que indica una inhibición autofágica (Runwal et al., 2019). Lo anterior puede ser confirmado al realizar el análisis de puntos de células N43/5 que presentan un constructo estable LC3-GFP-mCherry (**Figura 7, 12**). Este tiene la ventaja de ser pH-sensible, por lo que al fusionarse el autofagosoma con el lisosoma, va a existir un cambio de pH tal que la señal de GFP se pierde y en la superposición de canales solo se observan puntos rojos, mientras que en amarillo tenemos la presencia de todas aquellas vesículas neutrales como autofagosomas (Hansen & Johansen, 2011). De esta forma, es posible entonces seguir el flujo autofágico, por lo tanto, el observar un mayor número de autolisosomas (rojo) es indicativo

de un aumento en el flujo autofágico, por el contrario, si existe una disminución de estos se puede sugerir una inhibición autofágica (Leeman et al., 2018).

En resumen, y respecto al rol del AP, nuestro estudio pudo mostrar que la inducción de la ciliogénesis, previene la inhibición de la autofagia mediada por el tratamiento de este ácido graso a tiempos cortos (**Figura 7**). Para inducir ciliogénesis, se realizó el silenciamiento de la proteína MAP4, una proteína que regula negativamente el largo del cilio (Ávalos et al., 2022; Ghossoub et al., 2013; Mirvis et al., 2018). En el presente trabajo se muestra que al realizar el tratamiento con AP no sólo disminuyó el porcentaje de células ciliadas, sino también se redujo el largo del cilio primario (**Figura 7A-C**). Sin embargo, cuando la ciliogénesis fue inducida con un siRNA contra MAP4, el cilio primario no fue afectado tanto en número como en tamaño al realizar el tratamiento con AP (**Figura 9C-E**). Dado que AP disminuye la ciliogénesis a partir de las 2 h de tratamiento, se decidió realizar una curva temporal de estímulos con AP en células donde la ciliogénesis fue inducida, de esta forma se pudo determinar si la conservación del cilio primario previene el efecto del AP sobre la inhibición autofágica. Así, se observó que la inducción de ciliogénesis con el siRNA de MAP4 previno el bloqueo de la autofagia inducido por AP. Por lo tanto, se determinó que el cilio primario posee un papel protector frente a la inhibición de la autofagia inducida por AP.

El AP inhibe autofagia al romper la formación del complejo PKD2-BECN1 en el cilio primario.

Si bien múltiples estudios han dado cuenta del efecto de AP y otros ácidos grasos saturados sobre la autofagia (Hernández-Cáceres et al., 2019, 2020; X. H. Liang et al., 1999; Librán-Pérez et al., 2019), no hay claridad sobre el mecanismo por el cual el AP estaría mediando dicho efecto. Es por esto que se hipotetiza que AP inhibe la formación del complejo PKD2-BECN1, lo cual inhibe la autofagia, y esta vía se sugiere depende de la modulación de proteínas Rab, ya que se ve afectada la maduración autofagosomal, por lo que sería un mecanismo independiente de la acción de mTORC1

Finalmente, se realizó un análisis de flujo autofágico en células deficientes de cilio (N43/5 *cep164*^{-/-} y N43/5 transfectadas con un siIFT88) (**Figura 10**) y PKD2 (N43/5 *pkd2*^{-/-} y N43/5 transfectadas con siPKD2) (**Figura 12**). En ambos casos, se observó una inhibición de la autofagia

a nivel basal, por lo tanto, se puede inferir que el cilio primario y PKD2 son necesarios para promover la autofagia.

En conjunto, nuestros resultados dan luces de un nuevo mecanismo por el cual el cilio primario y PKD2 modulan la autofagia en células hipotalámicas N43/5. Así, el tratamiento con AP rompe la formación del complejo PKD2-BECN1, bloqueando la autofagia, lo que indica un posible mecanismo adicional por el cual los ácidos grasos saturados afectan la autofagia en el hipotálamo, como ocurre en la obesidad inducida por dietas altas en grasas (Hernández-Cáceres et al., 2019).

Conclusiones

En conclusión, este estudio confirma la hipótesis inicial al demostrar que el tratamiento con AP causa la pérdida del cilio primario y la disociación del complejo PKD2-BECN1, lo que a su vez conduce al bloqueo de la autofagia en células N43/5. En breve, se mostró que PKD2 y BECN1 forman un complejo proteico, el cual localiza en el cilio primario de células N43/5, y la formación del complejo PKD2-BECN1 fue dependiente del cilio primario. Además, se evidenció que tanto PKD2 como la presencia del cilio son elementos cruciales para activar la autofagia. De manera significativa, se demostró que el tratamiento con AP no solo interrumpe la formación del complejo PKD2-BECN1, sino también inhibe la autofagia en células N43/5. Por otro lado, se observó que la presencia del cilio ejerce una función preventiva frente al bloqueo de la autofagia inducido por el tratamiento con AP.

Estos descubrimientos proporcionan una nueva perspectiva sobre el mecanismo mediante el cual la autofagia puede ser regulada de manera dependiente del cilio primario en células hipotalámicas tipo POMC, lo que repercute directamente en las vías relacionadas con la sensación de saciedad. Investigaciones futuras son necesarias para comprender los mecanismos subyacentes a la acción del AP sobre el complejo ciliar PKD2-BECN1, y si esto puede ser revertido a través del uso de ácidos grasos mono- o poli-insaturados, para mantener un adecuado flujo autofágico.

Bibliografía

- Akella, J. S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N. G., Lyons-Abbott, S., Morrissette, N. S., Dougan, S. T., Kipreos, E. T., & Gaertig, J. (2010). MEC-17 is an α -tubulin acetyltransferase. *Nature*, *467*(7312), 218-222. <https://doi.org/10/d3mqhq>
- Al Saedi, A., Bermeo, S., Plotkin, L., Myers, D. E., & Duque, G. (2019). Mechanisms of palmitate-induced lipotoxicity in osteocytes. *Bone*, *127*, 353-359. <https://doi.org/10/gtvh5n>
- Aledavood, E., Moraes, G., Lameira, J., Castro, A., Luque, F. J., & Estarellas, C. (2019). Understanding the Mechanism of Direct Activation of AMP-Kinase: Toward a Fine Allosteric Tuning of the Kinase Activity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *59*(6), 2859-2870. <https://doi.org/10/g9xrq>
- Ao, X., Zou, L., & Wu, Y. (2014). Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. *Cell Death and Differentiation*, *21*(3), 348-358. <https://doi.org/10/f5sfj5>
- Ávalos, Y., Hernández-Cáceres, M. P., Lagos, P., Pinto-Nuñez, D., Rivera, P., Burgos, P., Díaz-Castro, F., Joy-Immediato, M., Venegas-Zamora, L., Lopez-Gallardo, E., Kretschmar, C., Batista-Gonzalez, A., Cifuentes-Araneda, F., Toledo-Valenzuela, L., Rodriguez-Peña, M., Espinoza-Caicedo, J., Perez-Leighton, C., Bertocchi, C., Cerda, M., ... Morselli, E. (2022). Palmitic acid control of ciliogenesis modulates insulin signaling in hypothalamic neurons through an autophagy-dependent mechanism. *Cell Death & Disease*, *13*(7), 659. <https://doi.org/10/gqnsz2>
- Avasthi, P., & Marshall, W. F. (2012). Stages of Ciliogenesis and Regulation of Ciliary Length. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *83*(2), S30-S42. <https://doi.org/10/fj82d6>
- Barker, A. R., Thomas, R., & Dawe, H. R. (2014). Meckel-Gruber syndrome and the role of primary cilia in kidney, skeleton, and central nervous system development. *Organogenesis*, *10*(1), 96-107. <https://doi.org/10/gtf973>
- Bechtel, W., Helmstädter, M., Balica, J., Hartleben, B., Schell, C., & Huber, T. B. (2013). The class III phosphatidylinositol 3-kinase PIK3C3/VPS34 regulates endocytosis and autophagosome-autolysosome formation in podocytes. *Autophagy*, *9*(7), 1097-1099. <https://doi.org/10/gtr6px>
- Beck, B. (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *361*(1471), 1159-1185. <https://doi.org/10/d9sksw>
- Bharate, S. B., Nemmani, K. V., & Vishwakarma, R. A. (2009). Progress in the discovery and development of small-molecule modulators of G-protein-coupled receptor 40 (GPR40/FFA1/FFAR1): An emerging target for type 2 diabetes. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *19*(2), 237-264. <https://doi.org/10/cbdqjp>
- Bieber, A., Capitanio, C., Erdmann, P. S., Fiedler, F., Beck, F., Lee, C.-W., Li, D., Hummer, G., Schulman, B. A., Baumeister, W., & Wilfling, F. (2022). In situ structural analysis reveals membrane shape transitions during autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(39), e2209823119. <https://doi.org/10/gq983k>
- Bishop, G. A., Berbari, N. F., Lewis, J., & Mykityn, K. (2007). Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *505*(5), 562-571. <https://doi.org/10/c7jntv>
- Boehlke, C., Kotsis, F., Patel, V., Braeg, S., Voelker, H., Bredt, S., Beyer, T., Janusch, H., Hamann, C., Gödel, M., Müller, K., Herbst, M., Hornung, M., Doerken, M., Köttgen, M.,

- Nitschke, R., Igarashi, P., Walz, G., & Kuehn, E. W. (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nature Cell Biology*, *12*(11), Article 11. <https://doi.org/10/d355v4>
- Borchers, A.-C., Langemeyer, L., & Ungermann, C. (2021). Who's in control? Principles of Rab GTPase activation in endolysosomal membrane trafficking and beyond. *The Journal of Cell Biology*, *220*(9), e202105120. <https://doi.org/10/grzb7k>
- Brill, A. L., & Ehrlich, B. E. (2020). Polycystin 2: A calcium channel, channel partner, and regulator of calcium homeostasis in ADPKD. *Cellular Signalling*, *66*, 109490. <https://doi.org/10/grmbsb>
- Čajánek, L., & Nigg, E. A. (2014). Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(28), E2841-2850. <https://doi.org/10/f59tjc>
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.-C., Waterfield, M. D., Backer, J. M., & Zerial, M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature Cell Biology*, *1*(4), 249-252. <https://doi.org/10/dgk4bh>
- Cloonan, S. M., Lam, H. C., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2014). «Ciliophagy»: The consumption of cilia components by autophagy. *Autophagy*, *10*(3), 532-534. <https://doi.org/10/ghwxdc>
- Cooper, D. M., Yoshimura, M., Zhang, Y., Chiono, M., & Mahey, R. (1994). Capacitative Ca²⁺ entry regulates Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases. *Biochemical Journal*, *297*(3), 437-440. <https://doi.org/10/gttw5z>
- Criollo, A., Altamirano, F., Pedrozo, Z., Schiattarella, G. G., Li, D. L., Rivera-Mejías, P., Sotomayor-Flores, C., Parra, V., Villalobos, E., Battiprolu, P. K., Jiang, N., May, H. I., Morselli, E., Somlo, S., de Smedt, H., Gillette, T. G., Lavandero, S., & Hill, J. A. (2018). Polycystin-2-dependent control of cardiomyocyte autophagy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *118*, 110-121. <https://doi.org/10/gdk8wj>
- Decuypere, J.-P., Parys, J. B., & Bultynck, G. (2012). Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells*, *1*(3), 284-312. <https://doi.org/10/ghd6gv>
- Decuypere, J.-P., Van Giel, D., Janssens, P., Dong, K., Somlo, S., Cai, Y., Mekahli, D., & Vennekens, R. (2021). Interdependent Regulation of Polycystin Expression Influences Starvation-Induced Autophagy and Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13511. <https://doi.org/10/gq7nsn>
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *19*(6), 349-364. <https://doi.org/10/gf3r3j>
- Douguet, D., Patel, A., & Honoré, E. (2019). Structure and function of polycystins: Insights into polycystic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, *15*(7), Article 7. <https://doi.org/10/grmbsd>
- Du, T., Yang, L., Xu, X., Shi, X., Xu, X., Lu, J., Lv, J., Huang, X., Chen, J., Wang, H., Ye, J., Hu, L., & Shen, X. (2019). Vincamine as a GPR40 agonist improves glucose homeostasis in type 2 diabetic mice. *Journal of Endocrinology*, *240*(2), 195-214. <https://doi.org/10/gtvh2w>
- Duffy, M. P., Sup, M. E., & Guo, X. E. (2021). Adenylyl cyclase 3 regulates osteocyte mechanotransduction and primary cilium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *573*, 145-150. <https://doi.org/10/gttwxk>
- Duldulao, N. A., Lee, S., & Sun, Z. (2009). Cilia localization is essential for in vivo functions of the Joubert syndrome protein Arl13b/Scorpion. *Development*, *136*(23), 4033-4042. <https://doi.org/10/cnfbhj>

- Filipova, A., Diaz Garcia, D., Dvorak, J., Filip, S., Jelicova, M., & Sinkorova, Z. (2020). Simple Detection of Primary Cilia by Immunofluorescence. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 159. <https://doi.org/10.3791/61155>
- Fisch, C., & Dupuis-Williams, P. (2011). Ultrastructure of cilia and flagella – back to the future! *Biology of the Cell*, 103(6), 249-270. <https://doi.org/10/c7t774>
- Garcia-Gonzalo, F. R., & Reiter, J. F. (2017). Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(2), a028134. <https://doi.org/10/f9n52h>
- Geng, L., Okuhara, D., Yu, Z., Tian, X., Cai, Y., Shibasaki, S., & Somlo, S. (2006). Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 7), 1383-1395. <https://doi.org/10/dw25dh>
- Ghossoub, R., Hu, Q., Failler, M., Rouyez, M.-C., Spitzbarth, B., Mostowy, S., Wolfrum, U., Saunier, S., Cossart, P., James Nelson, W., & Benmerah, A. (2013). Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *Journal of Cell Science*, 126(12), 2583-2594. <https://doi.org/10/gpsgs3>
- Grace Y. Liu, Liu, G. Y., Grace Y. Liu, David M. Sabatini, & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 183-203. <https://doi.org/10/gkskkq>
- Grieben, M., Pike, A. C. W., Shintre, C. A., Venturi, E., El-Ajouz, S., Tessitore, A., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S., Mahajan, P., Chalk, R., Burgess-Brown, N. A., Sitsapesan, R., Huiskonen, J. T., & Carpenter, E. P. (2017). Structure of the polycystic kidney disease TRP channel Polycystin-2 (PC2). *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(2), Article 2. <https://doi.org/10/grmbss>
- Guerra, F., & Bucci, C. (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells*, 5(3), Article 3. <https://doi.org/10/ghxnf6>
- Hall, N. A., & Hehnl, H. (2021). A centriole's subdistal appendages: Contributions to cell division, ciliogenesis and differentiation. *Open Biology*, 11(2), 200399. <https://doi.org/10/gtgd6k>
- Hansen, T. E., & Johansen, T. (2011). Following autophagy step by step. *BMC Biology*, 9(1), 39. <https://doi.org/10/bkzt5p>
- Harris, P. C., & Torres, V. E. (2009). Polycystic Kidney Disease. *Annual Review of Medicine*, 60(Volume 60, 2009), 321-337. <https://doi.org/10/d29gsd>
- He W, Tran A, Chen CT, Loganathan N, Bazinet RP, & Belsham DD. (2022). Oleate restores altered autophagic flux to rescue palmitate lipotoxicity in hypothalamic neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 557, 111753. <https://doi.org/10/gtdczm>
- Hernández-Cáceres, M. P., Cereceda, K., Hernández, S., Li, Y., Narro, C., Rivera, P., Silva, P., Ávalos, Y., Jara, C., Burgos, P., Toledo-Valenzuela, L., Lagos, P., Cifuentes Araneda, F., Perez-Leighton, C., Bertocchi, C., Clegg, D. J., Criollo, A., Tapia-Rojas, C., Burgos, P. V., & Morselli, E. (2020). Palmitic acid reduces the autophagic flux in hypothalamic neurons by impairing autophagosome-lysosome fusion and endolysosomal dynamics. *Molecular & Cellular Oncology*, 7(5), 1789418. <https://doi.org/10/gqkgbz>
- Hernández-Cáceres, M. P., Toledo-Valenzuela, L., Díaz-Castro, F., Ávalos, Y., Burgos, P., Narro, C., Peña-Oyarzun, D., Espinoza-Cacedo, J., Cifuentes-Araneda, F., Navarro-Aguad, F., Riquelme, C., Troncoso, R., Criollo, A., & Morselli, E. (2019). Palmitic Acid Reduces the Autophagic Flux and Insulin Sensitivity Through the Activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the Hypothalamic Neuronal Cell Line N43/5. *Frontiers in*

- Endocrinology*, 10, 176. <https://doi.org/10/gqkgbx>
- Hill, S. M., Wrobel, L., & Rubinsztein, D. C. (2019). Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation. *Cell Death & Differentiation*, 26(4), 617-629. <https://doi.org/10/gj2xm6>
- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: Building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(4), Article 4. <https://doi.org/10/bmzxqn>
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5360-5372. <https://doi.org/10/b5tc58>
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2009). Atg14 and UVRAG: Mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. *Autophagy*, 5(4), 534-536. <https://doi.org/10/d8nkgf>
- Jewell, J. L., Fu, V., Hong, A. W., Yu, F.-X., Meng, D., Melick, C. H., Wang, H., Lam, W.-L. M., Yuan, H.-X., Taylor, S. S., & Guan, K.-L. (2019). GPCR signaling inhibits mTORC1 via PKA phosphorylation of Raptor. *eLife*, 8, e43038. <https://doi.org/10/gttzx5>
- Jiang, P., & Mizushima, N. (2015). LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods (San Diego, Calif.)*, 75, 13-18. <https://doi.org/10/f654np>
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 18(4), 571-580. <https://doi.org/10/fs98cc>
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y., & Komatsu, M. (2015). P62/ SQSTM 1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *The FEBS Journal*, 282(24), 4672-4678. <https://doi.org/10/f77ghv>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132-141. <https://doi.org/10/d23zsg>
- Kipp, K. R., Kruger, S. L., Schimmel, M. F., Parker, N., Shillingford, J. M., Leamon, C. P., & Weimbs, T. (2018). Comparison of folate-conjugated rapamycin versus unconjugated rapamycin in an orthologous mouse model of polycystic kidney disease. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 315(2), F395-F405. <https://doi.org/10/gd3bfm>
- Kleene, S. J. (2022). Regenerative Calcium Currents in Renal Primary Cilia. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10/gs9x4p>
- Kowal, T. J., & Falk, M. M. (2015). Primary cilia found on HeLa and other cancer cells. *Cell Biology International*, 39(11), 1341-1347. <https://doi.org/10/grmbpp>
- Lai, Y., & Jiang, Y. (2020). Reciprocal Regulation between Primary Cilia and mTORC1. *Genes*, 11(6), 711. <https://doi.org/10/grmbsm>
- Lam, H. C., Cloonan, S. M., Bhashyam, A. R., Haspel, J. A., Singh, A., Sathirapongsasuti, J. F., Cervo, M., Yao, H., Chung, A. L., Mizumura, K., An, C. H., Shan, B., Franks, J. M., Haley, K. J., Owen, C. A., Tesfaigzi, Y., Washko, G. R., Quackenbush, J., Silverman, E. K., ... Choi, A. M. K. (2013). Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(12), 5212-5230. <https://doi.org/10/f5kd27>
- Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), Article 12. <https://doi.org/10/ggmw9x>
- Leeman, D. S., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A. E., McKay, A., Pollina, E. A., Dulken, B. W.,

- Zhao, X., Yeo, R. W., Ho, T. T., Mahmoudi, S., Devarajan, K., Passequé, E., Rando, T. A., Frydman, J., & Brunet, A. (2018). Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6381), 1277-1283. <https://doi.org/10/gc77km>
- Leprivier, G., & Rotblat, B. (2020). How does mTOR sense glucose starvation? AMPK is the usual suspect. *Cell Death Discovery*, 6(1), 1-5. <https://doi.org/10/gj42n8>
- Liang, C., Lee, J., Inn, K.-S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., & Jung, J. U. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*, 10(7), 776-787. <https://doi.org/10/d9j6h7>
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), Article 6762. <https://doi.org/10/cdd4jz>
- Librán-Pérez, M., Pereiro, P., Figueras, A., & Novoa, B. (2019). Antiviral activity of palmitic acid via autophagic flux inhibition in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 95, 595-605. <https://doi.org/10/gtb34b>
- Lieu, C. V., Loganathan, N., & Belsham, D. D. (2021). Mechanisms Driving Palmitate-Mediated Neuronal Dysregulation in the Hypothalamus. *Cells*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10/grmbqs>
- Lipowsky, H. H. (1995). Shear Stress in the Circulation. En J. A. Bevan, G. Kaley, & G. M. Rubanyi (Eds.), *Flow-Dependent Regulation of Vascular Function* (pp. 28-45). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7527-9_2
- Liu, W., Zhu, M., Liu, J., Su, S., Zeng, X., Fu, F., Lu, Y., Rao, Z., & Chen, Y. (2024). Comparison of the effects of monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids on the lipotoxicity of islets. *Frontiers in Endocrinology*, 15. <https://doi.org/10/gtvh5p>
- Liu, X., Tang, J., & Chen, X.-Z. (2022). Role of PKD2 in the endoplasmic reticulum calcium homeostasis. *Frontiers in Physiology*, 13, 962571. <https://doi.org/10/grmfb3>
- Liu, X., Vien, T., Duan, J., Sheu, S.-H., DeCaen, P. G., & Clapham, D. E. (2018). Polycystin-2 is an essential ion channel subunit in the primary cilium of the renal collecting duct epithelium. *eLife*, 7, e33183. <https://doi.org/10/grmbr4>
- Lőrincz, P., & Juhász, G. (2020). Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2462-2482. <https://doi.org/10/gm4vqh>
- Lu, J., Boheler, K. R., Jiang, L., Chan, C. W., Tse, W. W., Keung, W., Poon, E. N., Li, R. A., & Yao, X. (2018). Polycystin-2 Plays an Essential Role in Glucose Starvation-Induced Autophagy in Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 36(4), 501-513. <https://doi.org/10/gdbprt>
- McKnight, N. C., Zhong, Y., Wold, M. S., Gong, S., Phillips, G. R., Dou, Z., Zhao, Y., Heintz, N., Zong, W.-X., & Yue, Z. (2014). Beclin 1 Is Required for Neuron Viability and Regulates Endosome Pathways via the UVRAG-VPS34 Complex. *PLOS Genetics*, 10(10), e1004626. <https://doi.org/10/f6n9g4>
- Mei, Y., Glover, K., Su, M., & Sinha, S. C. (2016). Conformational flexibility of BECN1: Essential to its key role in autophagy and beyond. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 25(10), 1767-1785. <https://doi.org/10/ghwxcf>
- Mei, Y., Ramanathan, A., Glover, K., Stanley, C., Sanishvili, R., Chakravarthy, S., Yang, Z., Colbert, C. L., & Sinha, S. C. (2016). Conformational Flexibility Enables the Function of a BECN1 Region Essential for Starvation-Mediated Autophagy. *Biochemistry*, 55(13),

- 1945-1958. <https://doi.org/10/f8hm9x>
- Meng, Q., & Cai, D. (2011). Defective Hypothalamic Autophagy Directs the Central Pathogenesis of Obesity via the I κ B Kinase β (IKK β)/NF- κ B Pathway *. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32324-32332. <https://doi.org/10/dd53xx>
- Menon, M. B., & Dhamija, S. (2018). Beclin 1 Phosphorylation – at the Center of Autophagy Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10/gfjhtr>
- Mick, D. U., Rodrigues, R. B., Leib, R. D., Adams, C. M., Chien, A. S., Gygi, S. P., & Nachury, M. V. (2015). Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Developmental Cell*, 35(4), 497-512. <https://doi.org/10/f7zh2v>
- Mirvis, M., Stearns, T., & James Nelson, W. (2018). Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochemical Journal*, 475(14), 2329-2353. <https://doi.org/10/gd5d5d>
- Morleo, M., & Franco, B. (2021). The OFD1 protein is a novel player in selective autophagy: Another tile to the cilia/autophagy puzzle. *Cell Stress*, 5(3), 33-36. <https://doi.org/10/gr2brb>
- Morleo, M., Vieira, H. L. A., Pennekamp, P., Palma, A., Bento-Lopes, L., Omran, H., Lopes, S. S., Barral, D. C., & Franco, B. (2023). Crosstalk between cilia and autophagy: Implication for human diseases. *Autophagy*, 19(1), 24-43. <https://doi.org/10/grmbqh>
- Morselli, E., Criollo, A., Rodriguez-Navas, C., & Clegg, D. J. (2014). Chronic High Fat Diet Consumption Impairs Metabolic Health of Male Mice. *Inflammation and Cell Signaling*, 1(6), e561. <https://doi.org/10/gs9x2g>
- Mukhopadhyay, A., Nieves, E., Che, F.-Y., Wang, J., Jin, L., Murray, J. W., Gordon, K., Angeletti, R. H., & Wolkoff, A. W. (2011). Proteomic analysis of endocytic vesicles: Rab1a regulates motility of early endocytic vesicles. *Journal of Cell Science*, 124(5), 765-775. <https://doi.org/10/bmbrst>
- Nair, U., Yen, W.-L., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2012). A role for Atg8–PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy*, 8(5), 780-793. <https://doi.org/10/f368dp>
- Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A. E. H., Lu, W., Brown, E. M., Quinn, S. J., Ingber, D. E., & Zhou, J. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics*, 33(2), 129-137. <https://doi.org/10/cqx7qp>
- Nicholas, D. A., Zhang, K., Hung, C., Glasgow, S., Aruni, A. W., Unternaehrer, J., Payne, K. J., Langridge, W. H. R., & Leon, M. D. (2017). Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β . *PLOS ONE*, 12(5), e0176793. <https://doi.org/10/f95j7s>
- Niso-Santano, M., Malik, S. A., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Mariño, G., Cianfanelli, V., Ben-Younès, A., Troncoso, R., Markaki, M., Sica, V., Izzo, V., Chaba, K., Bauvy, C., Dupont, N., Kepp, O., Rockenfeller, P., Wolinski, H., Madeo, F., Lavandro, S., ... Kroemer, G. (2015). Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy. *The EMBO Journal*, 34(8), 1025-1041. <https://doi.org/10/f2x83d>
- Nissar, A. U., Sharma, L., & Tasduq, S. A. (2015). Palmitic acid induced lipotoxicity is associated with altered lipid metabolism, enhanced CYP450 2E1 and intracellular calcium mediated ER stress in human hepatoma cells. *Toxicology Research*, 4(5), 1344-1358. <https://doi.org/10/gtvh5m>
- Orhon, I., Dupont, N., Pampliega, O., Cuervo, A. M., & Codogno, P. (2015). Autophagy and

- regulation of cilia function and assembly. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 389-397. <https://doi.org/10/f62bq6>
- Orhon, I., Dupont, N., Zaidan, M., Boitez, V., Burtin, M., Schmitt, A., Capiod, T., Viau, A., Beau, I., Kuehn, E. W., Friedlander, G., Terzi, F., & Codogno, P. (2016). Primary-cilium-dependent autophagy controls epithelial cell volume in response to fluid flow. *Nature Cell Biology*, 18(6), 657-667. <https://doi.org/10/f8pj8x>
- Pala, R., Alomari, N., & Nauli, S. M. (2017). Primary Cilium-Dependent Signaling Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2272. <https://doi.org/10/gcqtqp>
- Pampliega, O., & Cuervo, A. M. (2016). Autophagy and primary cilia: Dual interplay. *Current Opinion in Cell Biology*, 39, 1-7. <https://doi.org/10/f8jbm4>
- Pampliega, O., Orhon, I., Patel, B., Sridhar, S., Díaz-Carretero, A., Beau, I., Codogno, P., Satir, B. H., Satir, P., & Cuervo, A. M. (2013). Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature*, 502(7470), 194-200. <https://doi.org/10/f5c7st>
- Pan, F., Bu, L., Wu, K., Wang, A., & Xu, X. (2023). PKD2/polycystin-2 inhibits LPS-induced acute lung injury in vitro and in vivo by activating autophagy. *BMC Pulmonary Medicine*, 23(1), 171. <https://doi.org/10/gr8rmv>
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., & Johansen, T. (2007). P62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24131-24145. <https://doi.org/10/b7m9wq>
- Park, J.-M., Seo, M., Jung, C. H., Grunwald, D., Stone, M., Otto, N. M., Toso, E., Ahn, Y., Kyba, M., Griffin, T. J., Higgins, L., & Kim, D.-H. (2018). ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy*, 14(4), 584-597. <https://doi.org/10/gcsxxk>
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell*, 122(6), 927-939. <https://doi.org/10/c9322j>
- Pazour, G. J., Dickert, B. L., Vucica, Y., Seeley, E. S., Rosenbaum, J. L., Witman, G. B., & Cole, D. G. (2000). Chlamydomonas IFT88 and Its Mouse Homologue, Polycystic Kidney Disease Gene Tg737, Are Required for Assembly of Cilia and Flagella. *Journal of Cell Biology*, 151(3), 709-718. <https://doi.org/10/fm9hbb>
- Peña-Oyarzun, D., Batista-Gonzalez, A., Kretschmar, C., Burgos, P., Lavandero, S., Morselli, E., & Criollo, A. (2020). Chapter Four—New emerging roles of Polycystin-2 in the regulation of autophagy. En L. Galluzzi (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 354, pp. 165-186). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.02.006>
- Peña-Oyarzun, D., Rodriguez-Peña, M., Burgos-Bravo, F., Vergara, A., Kretschmar, C., Sotomayor-Flores, C., Ramirez-Sarmiento, C. A., De Smedt, H., Reyes, M., Perez, W., Torres, V. A., Morselli, E., Altamirano, F., Wilson, C. A. M., Hill, J. A., Lavandero, S., & Criollo, A. (2021). PKD2/polycystin-2 induces autophagy by forming a complex with BECN1. *Autophagy*, 17(7), 1714-1728. <https://doi.org/10/ghxw75>
- Peña-Oyarzun, D., Troncoso, R., Kretschmar, C., Hernando, C., Budini, M., Morselli, E., Lavandero, S., & Criollo, A. (2017). Hyperosmotic stress stimulates autophagy via polycystin-2. *Oncotarget*, 8(34), 55984-55997. <https://doi.org/10/gbpmtc>
- Pirkmajer, S., & Chibalin, A. V. (2011). Serum starvation: Caveat emptor. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301(2), C272-C279. <https://doi.org/10/b2cw39>
- Portovedo, M., Ignacio-Souza, L. M., Bombassaro, B., Coope, A., Reginato, A., Razolli, D. S.,

- Torsoni, M. A., Torsoni, A. S., Leal, R. F., Velloso, L. A., & Milanski, M. (2015). Saturated Fatty Acids Modulate Autophagy's Proteins in the Hypothalamus. *PLOS ONE*, *10*(3), e0119850. <https://doi.org/10/gk369p>
- Reginato, A., de Fante, T., Portovedo, M., da Costa, N. F., Payolla, T. B., Miyamoto, J. É., Simino, L. A., Ignácio-Souza, L. M., Torsoni, M. A., Torsoni, A. S., & Milanski, M. (2016). Autophagy proteins are modulated in the liver and hypothalamus of the offspring of mice with diet-induced obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *34*, 30-41. <https://doi.org/10/f8wzz3>
- Runwal, G., Stamatakou, E., Siddiqi, F. H., Puri, C., Zhu, Y., & Rubinsztein, D. C. (2019). LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Scientific Reports*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10/ghwwg5>
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., & Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature Cell Biology*, *15*(7), 741-750. <https://doi.org/10/ghwwmt>
- Safaroghli-Azar, A., Sanaei, M.-J., Pourbagheri-Sigaroodi, A., & Bashash, D. (2023). Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) classes: From cell signaling to endocytic recycling and autophagy. *European Journal of Pharmacology*, *953*, 175827. <https://doi.org/10/gtzzz4>
- Salehi, A., Flodgren, E., Nilsson, N. E., Jimenez-Feltstrom, J., Miyazaki, J., Owman, C., & Olde, B. (2005). Free fatty acid receptor 1 (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell and Tissue Research*, *322*(2), 207-215. <https://doi.org/10/cqzzbh>
- Sang, L., Miller, J. J., Corbit, K. C., Giles, R. H., Brauer, M. J., Otto, E. A., Baye, L. M., Wen, X., Scales, S. J., Kwong, M., Huntzicker, E. G., Sfakianos, M. K., Sandoval, W., Bazan, J. F., Kulkarni, P., Garcia-Gonzalo, F. R., Seol, A. D., O'Toole, J. F., Held, S., ... Jackson, P. K. (2011). Mapping the NPHP-JBTS-MKS Protein Network Reveals Ciliopathy Disease Genes and Pathways. *Cell*, *145*(4), 513-528. <https://doi.org/10/d6czvh>
- Satir, P., & Christensen, S. T. (2007). Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annual Review of Physiology*, *69*(1), 377-400. <https://doi.org/10/cqnrnz>
- Senn, J. J. (2006). Toll-like Receptor-2 Is Essential for the Development of Palmitate-induced Insulin Resistance in Myotubes *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(37), 26865-26875. <https://doi.org/10/fbc2bt>
- Shen, P. S., Yang, X., DeCaen, P. G., Liu, X., Bulkley, D., Clapham, D. E., & Cao, E. (2016). The Structure of the Polycystic Kidney Disease Channel PKD2 in Lipid Nanodiscs. *Cell*, *167*(3), 763-773.e11. <https://doi.org/10/f88q86>
- Søreng, K., Neufeld, T. P., & Simonsen, A. (2018). Chapter One—Membrane Trafficking in Autophagy. En L. Galluzzi (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 336, pp. 1-92). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.001>
- Soto-Avellaneda, A., & Morrison, B. E. (2020). Signaling and other functions of lipids in autophagy: A review. *Lipids in Health and Disease*, *19*(1), 214. <https://doi.org/10/grxfw4>
- Su, Q., Hu, F., Ge, X., Lei, J., Yu, S., Wang, T., Zhou, Q., Mei, C., & Shi, Y. (2018). Structure of the human PKD1-PKD2 complex. *Science*, *361*(6406), eaat9819. <https://doi.org/10/gd8gdx>
- Sun, T., Li, X., Zhang, P., Chen, W.-D., Zhang, H., Li, D.-D., Deng, R., Qian, X.-J., Jiao, L., Ji, J., Li, Y.-T., Wu, R.-Y., Yu, Y., Feng, G.-K., & Zhu, X.-F. (2015). Acetylation of Beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth. *Nature*

- Communications*, 6(1), 7215. <https://doi.org/10/f7d22g>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2503-2518. <https://doi.org/10/fqjq2c>
- Thompson, C. L., McFie, M., Chapple, J. P., Beales, P., & Knight, M. M. (2021). Polycystin-2 Is Required for Chondrocyte Mechanotransduction and Traffics to the Primary Cilium in Response to Mechanical Stimulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), Article 9. <https://doi.org/10/gtj4q8>
- Timper, K., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: Pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 10(6), 679-689. <https://doi.org/10/gkgmsm>
- Toda, C., Santoro, A., Kim, J. D., & Diano, S. (2017). POMC Neurons: From Birth to Death. *Annual review of physiology*, 79, 209-236. <https://doi.org/10/gs9xz6>
- Torres, V. E., & Harris, P. C. (2014). Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25(1), 18-32. <https://doi.org/10/f5m2df>
- Tran, L. T., Park, S., Kim, S. K., Lee, J. S., Kim, K. W., & Kwon, O. (2022). Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(4), Article 4. <https://doi.org/10/gs9xzp>
- Tran, S., Fairlie, W. D., & Lee, E. F. (2021). BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation. *Cells*, 10(6), 1522. <https://doi.org/10/grmbq8>
- Tran, S., Juliani, J., Harris, T. J., Evangelista, M., Ratcliffe, J., Ellis, S. L., Baloyan, D., Reehorst, C. M., Nightingale, R., Luk, I. Y., Jenkins, L. J., Ghilas, S., Yakou, M. H., Inguanti, C., Johnson, C., Buchert, M., Lee, J. C., De Cruz, P., Duszcyc, K., ... Lee, E. F. (2024). BECLIN1 is essential for intestinal homeostasis involving autophagy-independent mechanisms through its function in endocytic trafficking. *Communications Biology*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10/gttzz2>
- Tremel, S., Ohashi, Y., Morado, D. R., Bertram, J., Perisic, O., Brandt, L. T. L., von Wrisberg, M.-K., Chen, Z. A., Maslen, S. L., Kovtun, O., Skehel, M., Rappsilber, J., Lang, K., Munro, S., Briggs, J. A. G., & Williams, R. L. (2021). Structural basis for VPS34 kinase activation by Rab1 and Rab5 on membranes. *Nature Communications*, 12(1), 1564. <https://doi.org/10/gj3kb8>
- Tripathi, P., Zhu, Z., Qin, H., Elsherbini, A., Crivelli, S. M., Roush, E., Wang, G., Spassieva, S. D., & Bieberich, E. (2021). Palmitoylation of acetylated tubulin and association with ceramide-rich platforms is critical for ciliogenesis. *Journal of Lipid Research*, 62, 100021. <https://doi.org/10/ghzkg6>
- Tuson, M., He, M., & Anderson, K. V. (2011). Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development*, 138(22), 4921-4930. <https://doi.org/10/c5wm57>
- Urso, C. J., & Zhou, H. (2021). Palmitic Acid Lipotoxicity in Microglia Cells Is Ameliorated by Unsaturated Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), Article 16. <https://doi.org/10/gscxh4>
- Vagena, E., Ryu, J. K., Baeza-Raja, B., Walsh, N. M., Syme, C., Day, J. P., Houslay, M. D., & Baillie, G. S. (2019). A high-fat diet promotes depression-like behavior in mice by suppressing hypothalamic PKA signaling. *Translational Psychiatry*, 9(1), 141. <https://doi.org/10/gkgmqv>

- Wang, Y., Chen, J., Wang, C., Chen, T., & He, L. (2024). GW9508 ameliorates cognitive dysfunction via autophagy pathway in streptozotocin-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *n/a(n/a)*. <https://doi.org/10/gtvh2r>
- Wayman, G. A., Impey, S., & Storm, D. R. (1995). Ca²⁺ Inhibition of Type III Adenylyl Cyclase in Vivo(*). *Journal of Biological Chemistry*, *270(37)*, 21480-21486. <https://doi.org/10/bmxwzd>
- Wu, C.-T., Hilgendorf, K. I., Bevacqua, R. J., Hang, Y., Demeter, J., Kim, S. K., & Jackson, P. K. (2021). Discovery of ciliary G protein-coupled receptors regulating pancreatic islet insulin and glucagon secretion. *Genes & Development*, *35(17-18)*, 1243-1255. <https://doi.org/10/gsvffn>
- Yamamoto, Y., & Mizushima, N. (2021). Autophagy and Ciliogenesis. *JMA Journal*, *4(3)*, 207-215. <https://doi.org/10/grmbq6>
- Yoshida, S., Shiratori, H., Kuo, I. Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J. A., Sasaki, H., Nakai, J., Dworniczak, B., Ehrlich, B. E., Pennekamp, P., & Hamada, H. (2012). Cilia at the Node of Mouse Embryos Sense Fluid Flow for Left-Right Determination via Pkd2. *Science*, *338(6104)*, 226-231. <https://doi.org/10/f39zst>
- Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, *14(2)*, 207-215. <https://doi.org/10/ghz6jd>
- Yuan, Y., Zhou, C., Guo, X., Ding, Y., Ma, S., Gong, X., Jiang, H., Wang, Y., & Wang, X. (2022). Palmitate impairs the autophagic flux to induce p62-dependent apoptosis through the upregulation of CYLD in NRCMs. *Toxicology*, *465*, 153032. <https://doi.org/10/gnxd33>
- Zhan, C. (2018). POMC Neurons: Feeding, Energy Metabolism, and Beyond. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1090*, 17-29. <https://doi.org/10/gs9xz7>
- Zhao, H., Khan, Z., & Westlake, C. J. (2023). Ciliogenesis membrane dynamics and organization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *133*, 20-31. <https://doi.org/10/gq2qxj>
- Zhao, Y. G., Codogno, P., & Zhang, H. (2021). Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22(11)*, 733-750. <https://doi.org/10/gmd572>
- Zheng, W., Yang, X., Hu, R., Cai, R., Hofmann, L., Wang, Z., Hu, Q., Liu, X., Bulkley, D., Yu, Y., Tang, J., Flockerzi, V., Cao, Y., Cao, E., & Chen, X.-Z. (2018). Hydrophobic pore gates regulate ion permeation in polycystic kidney disease 2 and 2L1 channels. *Nature Communications*, *9(1)*, 2302. <https://doi.org/10/gdr9wj>
- Zhou, F., Wu, Z., Zhao, M., Murtazina, R., Cai, J., Zhang, A., Li, R., Sun, D., Li, W., Zhao, L., Li, Q., Zhu, J., Cong, X., Zhou, Y., Xie, Z., Gyurkovska, V., Li, L., Huang, X., Xue, Y., ... Segev, N. (2019). Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *Journal of Cell Biology*, *218(6)*, 1908-1927. <https://doi.org/10/ghwxf3>
- Zhou, F., Zou, S., Chen, Y., Lipatova, Z., Sun, D., Zhu, X., Li, R., Wu, Z., You, W., Cong, X., Zhou, Y., Xie, Z., Gyurkovska, V., Liu, Y., Li, Q., Li, W., Cheng, J., Liang, Y., & Segev, N. (2017). A Rab5 GTPase module is important for autophagosome closure. *PLOS Genetics*, *13(9)*, e1007020. <https://doi.org/10/gbx784>
- Zhu, P., Sieben, C. J., Xu, X., Harris, P. C., & Lin, X. (2017). Autophagy activators suppress cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. *Human Molecular Genetics*, *26(1)*, 158-172. <https://doi.org/10/grmbp>