



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

PAPEL DE LA POLICISTINA-1 EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE C-MYC Y BIN1 EN LOS CARDIOMIOCITOS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Directora

Dra. Zully Pedrozo Cibils

Programa de Fisiología y Biofísica,
ICBM, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile

Patrocinante

Dr. Guillermo Díaz Araya

Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica, Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacéuticas, Universidad
de Chile

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente agradezco a la Dra. Zully Pedrozo por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar este trabajo bajo su tutela, por su confianza, comprensión y enorme calidad humana. También quisiera agradecer a todos los miembros del LMFC por su colaboración, por la discusión de resultados, por aportar con ideas y por hacer más ameno el día a día en el laboratorio. Por otra parte, quisiera agradecer a mi familia por su cariño incondicional, en especial a mi madre que me ha acompañado y apoyado siempre. Finalmente quisiera agradecer a mis amigos por su apoyo fundamental y por ayudarme a seguir mejorando como persona.

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT REGULAR N° 1180613 (Zully Pedrozo Cibils, investigador principal). El desarrollo de esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Mecanotransducción en la Fisiopatología Cardíaca, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Esta memoria dio origen a la siguiente presentación en modalidad poster: La expresión de c-Myc en los cardiomiocitos es dependiente del mecanosensor Policistina-1, Congreso SCHCF 2019.

FELIPE IGNACIO POBLETE GUZMÁN

Santiago, Chile

- 2020 -

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	2
FINANCIAMIENTO	2
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
Cardiomiocito y función cardiaca	10
Túbulos-T	11
Amphiphysin-2/BIN1	11
Policistina-1	12
Policistina-1 y función cardiaca	13
Factor transcripcional c-Myc	14
Policistina-1, BIN1 y c-Myc	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES y MÉTODOS	17
Reactivos	17
Animales	17
Obtención de tejido ventricular desde ratones C57BL/6	18
Cultivo de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata	18
Transfecciones y transducciones de los cardiomiocitos neonatos en cultivo	18
Inmunoblot	19
Extracción de proteínas	19

Cuantificación de la concentración de proteína	19
Electroforesis y detección de la señal quimioluminiscente	19
Análisis densitométrico y cuantificación de la señal quimioluminiscente	20
Extracción de RNA y RT-qPCR	20
Extracción del RNA celular total	20
Cuantificación del RNA celular total	20
Síntesis de cDNA - Reacción de Transcripción Reversa	20
qPCR	20
Cálculo de las abundancias relativas de las isoformas de <i>BIN1</i>	21
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	23
1. La expresión deficiente de la Policistina-1 (PC1) produce un aumento de la expresión del factor transcripcional c-Myc	23
2. La sobreexpresión de la cola C-terminal de la PC1 (PC1-CTT) produce una regulación negativa del factor transcripcional c-Myc	24
3. La expresión deficiente de c-Myc modula la expresión de las isoformas de <i>BIN1</i>	25
4. La expresión deficiente de PC1 modula la expresión de las isoformas de <i>BIN1</i>	27
5. La sobreexpresión de PC1-CTT modula la expresión de las isoformas de <i>BIN1</i>	29
DISCUSIÓN	32
PC1 como supresor de c-Myc	32
c-Myc como modulador del splicing de <i>BIN1</i>	33
Policistina-1 como regulador del splicing de <i>BIN1</i>	34
CONCLUSIONES	36
PROYECCIONES	37
ANEXO	38
REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.- Esquema de la hipótesis	16
Figura 2.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles proteicos de c-Myc	23
Figura 3.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles del transcrito de <i>c-Myc</i>	24
Figura 4.- Efecto de la sobreexpresión de PC1-CTT sobre los niveles proteicos y del transcrito de <i>c-Myc</i>	25
Figura 5.- Efecto de la deficiencia de c-Myc sobre los niveles totales del transcrito de <i>BIN1</i>	26
Figura 6.- Efecto de la deficiencia de c-Myc sobre los niveles de los transcritos de las isoformas de <i>BIN1</i>	27
Figura 7.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles totales del transcrito de <i>BIN1</i>	28
Figura 8.- Efecto de la disminución de la PC1 en los cardiomiocitos sobre los niveles de los transcritos de las isoformas de <i>BIN1</i>	29
Figura 9.- Efecto de la sobreexpresión de la PC1-CTT sobre los niveles totales del transcrito de <i>BIN1</i>	29
Figura 10.- Efecto de la sobreexpresión de PC1-CTT sobre los niveles de los transcritos de las isoformas de <i>BIN1</i>	30
Figura A.- Niveles de mRNA del gen de la PC1 en cardiomiocitos knockdown para PC1	38
Figura B.- Niveles del contenido de mRNA de c-Myc en cardiomiocitos knockdown para dicho factor transcripcional	38
Figura C.- Niveles proteicos de c-Myc en cardiomiocitos knockdown para dicho factor transcripcional	39
Figura D.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles del transcrito de <i>c-Myc</i> en ratones PC1 KO de 5 meses de edad	39
Figura E.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles del transcrito de <i>c-Myc</i> en ratones PC1 KO de 7 meses de edad	40
Tabla 1.- Anticuerpos y condiciones experimentales utilizadas	21
Tabla 2.- Secuencia de partidores	22

ABREVIATURAS

- DNA, *DeoxyriboNucleic Acid* (Ácido Desoxirribo Nucleico)
- RNA, *RiboNucleic Acid* (Ácido Ribo Nucleico)
- E-C Coupling, *Excitation-Contraction Coupling* (Acoplamiento de Excitación-Constracción)
- BSA, *Bovine Serum Albumin* (Albúmina de Suero Bovino)
- ANOVA, *ANalysis Of VAriance* (Análisis de la Varianza)
- LTCC, *L-Type Calcium Channel* (Canal de Calcio Tipo-L)
- cDNA, *complementary DNA* (DNA complementario)
- c-Myc, *cellular Myelocytomatosis*
- PC1-CTT, *Polycystin-1 C-Terminal Tail* (Cola C-terminal de la PC1)
- SERCA, *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase* (Ca²⁺-ATPasa del Retículo Sarco/Endoplásmico)
- ADPKD, *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease* (Enfermedad Renal Poliquística Autosómica Dominante)
- GAPDH, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)
- Ca²⁺, Ión calcio
- MOI, *Multiplicity of Infection* (Multiplicidad de la Infección)
- PBS, *Phosphate Buffered Saline* (Solución salina tamponada con fosfato)
- PC1, *Polycystin-1* (Policistina-1)
- PC1 KO, *Polycystin-1 KnockOut mice* (ratones deficientes de PC1 en tejido cardiaco)

- PC2, *Polycystin-2* (Policistina-2)
- Pkd1, *Polycystic Kidney Disease 1*
- Pkd2, *Polycystic Kidney Disease 2*
- RyR, *Ryanodine Receptors* (Receptores de Rianodina)
- SR, *Sarcoplasmic Reticulum* (Retículo Sarcoplásmico)
- siRNA, *small interfering RNA*

RESUMEN

La Policistina-1 (PC1) es un mecanosensor fundamental para la correcta contractilidad cardíaca y su ausencia en los cardiomiocitos se relaciona con la disminución de los niveles proteicos de los canales de calcio tipo-L (LTCC). Los túbulos-T, invaginaciones del sarcolema cruciales para la función cardíaca, son estructuras que mantienen en las diadas a los LTCC, evitando su rápida degradación, por lo que cualquier alteración en su formación, redundaría en la degradación de los canales y disminución de la función contráctil. Una de las proteínas involucradas en la formación de los túbulos-T es BIN1, la cual presenta en el corazón 2 isoformas ubicuas (BIN1 y BIN1+17) e isoformas 2 cardio-específicas (BIN1+13 y BIN1+13+17). A pesar de su importancia, se desconoce hasta el momento las vías que regulan la expresión de *BIN1* en los cardiomiocitos. Por otro lado, mientras en células cancerosas la expresión de *BIN1* es regulada negativamente por el factor transcripcional c-Myc, en células renales la PC1 es un supresor de la expresión de c-Myc, por lo cual en esta tesis se propuso estudiar la relación entre la PC1, c-Myc y BIN1 en los cardiomiocitos.

El objetivo de este trabajo fue determinar el papel de la PC1 en la expresión de c-Myc y su relación con la expresión de *BIN1* y sus isoformas en los cardiomiocitos, para lo cual se utilizaron ratones KnockOut cardio-específicos para la PC1 y cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas. Se utilizaron siRNAs para la PC1 o c-Myc y adenovirus para sobreexpresar la cola C-terminal de la PC1. Se detectaron los niveles proteicos de c-Myc a través de inmunoblot, mientras que el mRNA de la PC1, las isoformas de *BIN1* y el mRNA de c-Myc se detectaron por RT-qPCR. Se utilizó t-Test o ANOVA de una vía seguido de un post test de Tukey para el análisis estadístico.

Nuestros resultados muestran que la disminución de la expresión de la PC1 induce la expresión de c-Myc, mientras que su sobreexpresión la inhibe. Sin embargo, tanto la disminución de la expresión de c-Myc como de la PC1 regulan de manera similar la expresión diferencial de las isoformas de *BIN1*, sin cambios en la expresión de *BIN1* total. Más aún, la disminución de c-Myc o la sobreexpresión de la cola c-terminal de PC1, aumentan la expresión de BIN1+13 y disminuyen la de BIN1+13+17. Esta aparente contradicción, podría deberse a que cualquier desregulación de la expresión de la PC1 tiene como efecto la misma respuesta celular, como está descrito en células renales.

Estos datos sugieren por primera vez que la PC1 es un inhibidor negativo de *c-Myc* en los cardiomiocitos, lo cual se relaciona con la expresión diferencial de las isoformas de *BIN1*.

ABSTRACT

Polycystin-1 (PC1) is a fundamental mechanosensor for correct cardiac contractility and its absence in cardiomyocytes is related to the decrease in protein levels of L-type calcium channels (LTCC). T-tubules, invaginations of the sarcolemma crucial for cardiac function, are structures that maintain LTCCs in dyads, preventing their rapid degradation, so that any alteration in their formation, results in the degradation of channels and decreased contractile function. One of the proteins involved in the formation of T-tubules is BIN1, which has 2 ubiquitous isoforms in the heart (BIN1 and BIN1+17) and 2 cardio-specific isoforms (BIN1+13 and BIN1+13+17). Despite its importance, the pathways that regulate *BIN1* expression in cardiomyocytes are so far unknown. On the other hand, while in cancer cells the expression of *BIN1* is negatively regulated by the transcriptional factor *c-Myc*, in renal cells PC1 is a suppressor of *c-Myc* expression, which is why in this thesis it was proposed to study the relationship between PC1, *c-Myc* and BIN1 in cardiomyocytes.

The objective of this work was to determine the role of PC1 in the expression of *c-Myc* and its relationship with the expression of *BIN1* and its isoforms in cardiomyocytes, for which PC1-specific KnockOut mice were used and culture of cardiomyocytes from neonatal rats. siRNAs for PC1 or *c-Myc* and adenoviruses were used to overexpress the C-terminal tail of PC1. Protein levels of *c-Myc* were detected through immunoblot, while PC1 mRNA, *BIN1* isoforms and *c-Myc* mRNA were detected by RT-qPCR. One-way t-Test or ANOVA followed by a Tukey post test was used for statistical analysis.

Our results show that the decrease in the expression of PC1 induces the expression of *c-Myc*, while its overexpression inhibits it. However, both decreased *c-Myc* and PC1 expression similarly regulate differential expression of *BIN1* isoforms, with no change in total *BIN1* expression. Furthermore, the decrease in *c-Myc* or the overexpression of the C-terminal tail of PC1, increases the expression of BIN1+13 and decreases that of BIN1+13+17. This apparent contradiction could be because any deregulation of PC1 expression has the same cellular response as described in kidney cells.

These data suggest for the first time that PC1 is a negative inhibitor of *c-Myc* in cardiomyocytes, which is related to the differential expression of *BIN1* isoforms.

INTRODUCCIÓN

Cardiomiocito y función cardíaca

El corazón está formado por diversos tipos de células que contribuyen a sus propiedades estructurales, bioquímicas, mecánicas y eléctricas, siendo los cardiomiocitos las células musculares encargadas de la contracción sincrónica durante el periodo de sístole cardíaca¹.

Los cardiomiocitos se contraen cuando un potencial de acción posibilita la apertura del canal de calcio tipo-L dependiente de voltaje (*L-Type Calcium Channel*, LTCC), desencadenándose un influjo del ión calcio (Ca^{2+}) al intracelular, con la posterior salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (*Sarcoplasmic Reticulum*, SR) hacia el citoplasma a través de los receptores de rianodina (*Ryanodine Receptors*, RyR). Este proceso es conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , evento que culmina con la activación de la maquinaria contráctil del cardiomiocito².

Posteriormente, la relajación cardíaca durante la diástole procede con la disociación del Ca^{2+} de la maquinaria contráctil, por medio de su internalización en el lumen del SR, gracias a la acción de la Ca^{2+} -ATPasa del Retículo Sarco/Endoplásmico (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*, SERCA). El remanente de Ca^{2+} citoplasmático es transportado hacia el extracelular por medio del intercambiador sodio-calcio y en mucho menor grado por la Ca^{2+} -ATPasa del sarcolema².

Los eventos que cursan con la despolarización del sarcolema, la elevación del Ca^{2+} citoplasmático y el inicio de la contracción se conocen como acoplamiento de excitación-contracción (*Excitation-Contraction Coupling*, *E-C Coupling*). La yuxtaposición de los LTCC y RyR forman complejos llamados diadas, que son estructuras dependientes de la integridad de invaginaciones del sarcolema llamadas túbulos transversos o túbulos-T³.

Los túbulos-T concentran una gran cantidad de canales iónicos y proteínas implicadas en el E-C Coupling, por lo que la pérdida de la funcionalidad de estos trae consigo efectos deletéreos en la capacidad contráctil del corazón, frente a los cuales pueden acontecer patologías como la insuficiencia cardíaca⁴.

Túbulos-T

Los túbulos-T son invaginaciones transversales de la membrana plasmática de los cardiomiocitos, situados sobre la línea Z de los sarcómeros. Estos organelos membranosos forman un sistema altamente ramificado de redes intracelulares, el cual corre por el eje longitudinal de los cardiomiocitos. Este sistema es particularmente desarrollado en cardiomiocitos ventriculares adultos⁵.

La bicapa fosfolipídica de los túbulos-T forma microdominios, los cuales poseen una alta densidad de canales iónicos y moléculas de señalización claves para el E-C Coupling, siendo así cruciales para la liberación sincrónica del Ca^{2+} en el citoplasma de los cardiomiocitos posterior a la estimulación eléctrica^{5,6}.

La red de túbulos-T es extremadamente dinámica y responde tanto a factores biofísicos como bioquímicos, alterándose en respuesta a las demandas fisiológicas y en condiciones patológicas⁵. Se ha propuesto un modelo de tres niveles para la regulación de los túbulos-T: a) factores bioquímicos, como la presencia de la proteína amphiphysin-2/BIN1, los que permiten la formación de estas invaginaciones tubulares del sarcolema, el reclutamiento y posterior concentración de los LTCC en estas estructuras, b) moléculas sensibles a factores biomecánicos, como la proteína Junctofilina-2, la cual promueve la interacción correcta del SR con los RyR y c) a través de moléculas mecanosensibles responsables de la regulación dinámica de los túbulos-T cuando cambian las condiciones fisiológicas⁵.

La plasticidad de estas estructuras representa una oportunidad en el restablecimiento del equilibrio fisiológico perdido en ciertas patologías cardíacas, por lo que es de interés estudiar las vías que modulan la formación y la funcionalidad de los túbulos-T. Este conocimiento nos podría permitir revelar nuevos blancos terapéuticos a nivel molecular y en este contexto, la proteína BIN1 implicada en la biogénesis de los túbulos-T resulta atractiva^{7,8}.

Amphiphysin-2/BIN1

El gen *BIN1* está compuesto por 20 exones y codifica un set de proteínas (~45 - 80 kDa) generadas por splicing alternativo, las cuales ejecutan funciones en la dinámica de membrana, progresión del ciclo celular, reparación del Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*, DNA), mientras que, en células cancerosas, BIN1 posee un rol como proteína supresora de tumores. Todos los productos de la expresión de *BIN1*, contienen un

N-terminal con dominios BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) y un C-terminal el cual puede interactuar con el citoesqueleto y con otras proteínas intracelulares⁹.

Debido al splicing alternativo, el cardiomiocito expresa 4 isoformas diferentes: 2 isoformas ubicuas: BIN1 (excluye los exones 7, 11 y 13-17) y BIN1+17 (BIN1 + exón 17) y 2 variantes tejido-específicas: BIN1+13 (BIN1 + exón 13) y BIN1+13+17 (BIN1 + exón 13 + exón 17)^{7, 9}. Las isoformas cardiacas de BIN1 están implicadas en la formación de invaginaciones del sarcolema del cardiomiocito^{10, 11}, en el tráfico y concentración de los LTCC hacia los túbulos-T¹². Por otra parte, BIN1 genera zonas de difusión lenta, con concentraciones diferentes de iones extracelulares, lo cual es requerido para la correcta función contráctil del cardiomiocito¹⁰.

La expresión de *BIN1* está regulada negativamente durante la insuficiencia cardiaca, lo cual se asocia a una menor formación de los túbulos-T, pérdida de su ultraestructura y disminución del tráfico de los LTCC a los mismos¹³, pero aún se desconoce cómo se regula la expresión de *BIN1* en el corazón. Datos preliminares no publicados de nuestro laboratorio sugieren que un mecanosensor llamado Policistina-1 podría ser requerido para su correcta expresión en los cardiomiocitos.

Policistina-1

El gen *PKD1* codifica una gran proteína transmembrana conocida como Policistina-1 (PC1, ~450 kDa), la cual se expresa en variados tejidos, como corazón, hígado y en células renales, donde su función ha sido principalmente caracterizada^{14, 15}. Mutaciones de este gen inducen el desarrollo de la Enfermedad Renal Poliquística Autosómica Dominante (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*, ADPKD) en aproximadamente el 85% de los casos, siendo aproximadamente el 15% restante producto de mutaciones del gen *PKD2*, que codifica para la proteína Policistina-2 (PC2), una proteína de ~110 kDa que actúa como canal iónico permeable al Ca²⁺¹⁵.

La PC1 posee un gran N-terminal extracelular con variados dominios, los cuales podrían estar involucrados en interacciones proteína-proteína, 11 dominios transmembrana y un C-terminal pequeño (~200 aminoácidos)¹⁶, el cual puede ser fosforilado por PKA y una tirosina kinasa tipo c-Src¹⁷. Por otra parte, la cola C-terminal (*Polycystin-1 C-Terminal Tail*, PC1-CTT), puede sufrir cortes que generan fragmentos con capacidad de modular la vía STAT6/p100¹⁸, la vía Wnt/ β -catenina¹⁹ y la activación transcripcional de TCF/CHOP por medio de p300²⁰. Además de lo anterior, la PC1 interactúa con una gran variedad de

proteínas, por lo que modula diversas vías transduccionales, siendo implicada en procesos como la formación del hueso, progresión de tumores, adhesión, proliferación y diferenciación celular; consecuentemente, se han asociado desbalances de su expresión a mecanismos patogénicos en enfermedades como la ADPKD^{21, 22}.

Se ha descrito a la PC1 como una proteína mecanosensora capaz de sensar fuerzas extracelulares como la tensión mecánica, fuerzas compresivas, rigidez de la matriz extracelular y el estrés de cizallamiento²³, convirtiendo estas señales biofísicas en una respuesta bioquímica, permitiendo su integración al interior de la célula^{24 - 26}.

Policistina-1 y función cardíaca

Nuestro laboratorio ha demostrado que la PC1 actúa también como un mecanosensor en los cardiomiocitos, mediando la hipertrofia cardíaca inducida por estrés mecánico in vitro (modelo de estrés hipo-osmótico) y por sobrecarga de presión in vivo (constricción aortica transversa), de esta manera, ratones deficientes para la expresión de PC1 en los cardiomiocitos (PC1 KO) no desarrollan hipertrofia ni fibrosis del tejido cardíaco²⁷.

Además, la ausencia de esta proteína en los cardiomiocitos induce una contractilidad cardíaca deficiente, con disminución del contenido proteico de los LTCC, lo que podría explicar, aunque sea en parte, la disminución de la contractilidad observada^{27, 28}. Datos no publicados de nuestro laboratorio indican que estos ratones desarrollan insuficiencia cardíaca y mueren aproximadamente a los 7 meses de vida. Teniendo en cuenta que el remodelamiento de los túbulos-T es uno de los determinantes de la disminución de los niveles proteicos de los LTCC^{5, 7}, la PC1 podría estar implicada en el mantenimiento de dichas estructuras.

Considerando que datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la PC1 podría regular positivamente la expresión de *BIN1* y siendo esta proteína crucial para la formación de los túbulos-T, junto a la mantención de la funcionalidad cardíaca, la disfunción cardíaca observada en los ratones PC1 KO podría tener como base una tubulogénesis deficiente; sin embargo, aún se desconoce de manera acabada si la PC1 podría regular los niveles de *BIN1* en los cardiomiocitos y el mecanismo molecular implicado.

La regulación de la expresión de *BIN1* ha sido poco estudiada hasta el momento. Aún a pesar de lo anterior, en células cancerosas se encuentra reportado que la expresión de *BIN1* depende del factor transcripcional c-Myc²⁹.

Factor transcripcional c-Myc

c-Myc es una proteína altamente regulada, la cual está implicada en una amplia variedad de procesos biológicos como el crecimiento celular, apoptosis, metabolismo, transformación y proliferación celular³⁰⁻³². Los productos de expresión de *c-Myc* se localizan principalmente en el núcleo y poseen dominios de unión a la doble hebra del DNA. c-Myc se asocia con otra proteína llamada MAX (*Myc-associated factor X*), formando heterodímeros para ejercer su función como factor transcripcional³³.

El protooncogén *c-Myc* ha sido uno de los más estudiados en el contexto de los mecanismos de desregulación que presentan las células cancerosas³⁴, pero, además se ha reportado la participación de este factor transcripcional en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares³⁵. Así, corazones hipertróficos presentan niveles de expresión aumentados de *c-Myc* y durante el remodelado cardiaco se regulan positivamente genes de expresión rápida de programas fetales como *c-Myc*, *c-Fos* y *c-Jun*³⁶.

En células renales la ausencia de la PC1 trae consigo un aumento de la expresión de *c-Myc*³⁷⁻³⁹, sugiriendo que este mecanosensor puede inhibir, aunque sea parcialmente, la expresión de dicho factor transcripcional y por tanto sus efectos en el crecimiento, proliferación e inhibición de la apoptosis en las células del tejido quístico renal⁴⁰.

En el contexto de las patologías cardíacas, un supresor de c-Myc podría ser una opción terapéutica interesante y en este sentido la PC1 podría tener un papel clave.

Policistina-1, BIN1 y c-Myc

Se ha descrito que en la ADPKD y en modelos murinos mutados para el gen *Pkd1*, los niveles proteicos y del transcrito de *c-Myc* están regulados positivamente³⁷⁻³⁹. Por otra parte, se ha reportado que la PC1 podría estar involucrada en la inhibición del eje Wnt canónico a través del clivaje de su cola C-terminal y la interacción física de la misma con β -catenina, resultando en una regulación negativa de la cascada transduccional Wnt/ β -catenina/*c-Myc*¹⁹.

De acuerdo con lo anterior existen evidencias de que la PC1 podría actuar como un supresor de *c-Myc* en células renales; sin embargo, el papel de la PC1 sobre *c-Myc* en los cardiomiocitos es desconocido.

Por otra parte, y si bien inicialmente BIN1 fue presentada como un supresor de tumores a través de su interacción con el N-terminal de *c-Myc*^{9, 41, 42}, se encuentra también

descrito que c-Myc es capaz de regular negativamente la expresión de *BIN1* en células cancerosas²⁹, sugiriendo así la posibilidad de una relación entre la PC1, c-Myc y BIN1.

En base a lo anterior, en esta tesis se postula que la PC1 regula positivamente la expresión de *BIN1* y/o sus isoformas en los cardiomiocitos, a través de la disminución de la expresión del factor transcripcional c-Myc.

HIPÓTESIS

La Policistina-1 induce la expresión de *BIN1* y/o sus isoformas a través de la represión de la expresión de *c-Myc* en los cardiomiocitos.

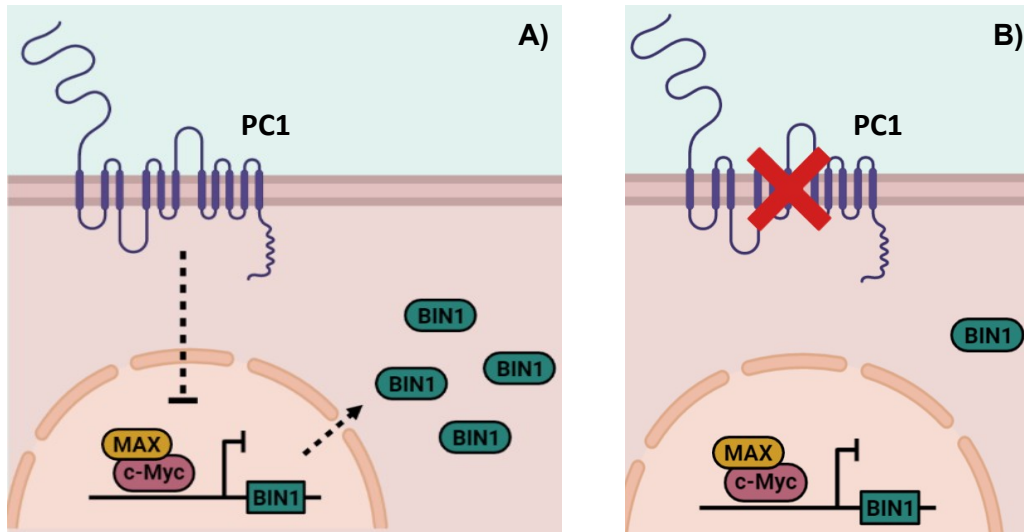


Figura 1.- Esquema de la hipótesis. A) Policistina-1 regula positivamente la expresión de *BIN1* por medio de la supresión de *c-Myc*. **B)** La pérdida de Policistina-1 se relaciona con una expresión disminuida de *BIN1*. Creado en [biorender.com](https://www.biorender.com).

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la Policistina-1 en la expresión del factor transcripcional *c-Myc* y su relación con la expresión de *BIN1* y sus isoformas en los cardiomiocitos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar cambios en la expresión de *c-Myc* dependientes de PC1 en cardiomiocitos en cultivo y en tejido cardíaco ventricular de ratones PC1 KO.
- 2.- Evaluar en cardiomiocitos en cultivo el papel de *c-Myc* en la expresión de *BIN1* y sus isoformas.
- 3.- Estudiar la relación entre la PC1 y la expresión de *BIN1* en cardiomiocitos en cultivo y en tejido cardíaco de ratones PC1 KO.

MATERIALES y MÉTODOS

Reactivos

Pancreatina, 5'-bromo-2'-desoxiuridina, siPC1 y sic-Myc fueron provistos por Sigma-Aldrich. PBS 1X, DMEM, M199, Suero fetal bovino, Suero equino, Penicilina/Estreptomicina 100X y H₂O libre de RNAsas y DNAsas se obtuvieron de HyClone, GE Healthcare Life Sciences. L-glutamina 200 mM y Opti-MEM fueron provistos por Gibco, ThermoFisher Scientific. Oligofectamina, QuBit RNA HS Assay Kit y SYBR Green se adquirieron de Invitrogen, ThermoFisher Scientific. Ad-FLM y Ad-Null se adquirieron de Vector Biolabs. T-PER y BSA 2 mg/mL fueron provistos por ThermoFisher Scientific. cOmplete - Inhibitor Cocktail Tablets y PhosSTOP - Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets se obtuvieron de Roche, Sigma-Aldrich. Protein Assay Dye Reagent y iScript cDNA synthesis Kit se adquirieron de Bio-Rad, en tanto el TRIsure y el cloroformo se adquirieron de Biorline y Merck, respectivamente.

Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 de 9-12 semanas de vida, con un silenciamiento selectivo para el gen de la Policistina-1 (*Pkd1*) específicamente en los cardiomiocitos, (KnockOut para la PC1, PC1 KO). De acuerdo con lo descrito en la literatura²⁷, estos animales se obtuvieron a través de la cruce entre ratones modificados genéticamente para portar un gen para la recombinasa Cre, cuya expresión es controlada por el promotor de la cadena pesada de la α -miosina (α -MHC Cre) y ratones que poseen los alelos del gen *Pkd1* flanqueados por sitios loxP (*Pkd1*^{flox/flox}). Como controles se usaron ratones C57BL/6 α -MHC Cre y/o ratones *Pkd1*^{flox/flox}.

Se utilizaron además ratas Sprague-Dawley neonatas de 1-3 días de vida de ambos sexos, para el aislamiento y cultivo de cardiomiocitos neonatos.

La mantención y manipulación de estos animales se realizó de acuerdo con las normas éticas establecidas para animales de experimentación (Guide for the care and use of laboratory animals, National Institutes of Health, EE. UU., 2011). Proyecto aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA#0997/FMUCH y CBA#1099/FMUCH).

Obtención de tejido ventricular desde ratones C57BL/6

Los ratones fueron expuestos a isoflurano calidad USP al 0,1 % (1 mg/L, dosis correspondiente a la de eutanasia) en un recipiente de vidrio herméticamente sellado (Baxter Healthcare). Una vez evidenciados signos de sedo-analgésia profunda se realizó la apertura del tórax para extraer el corazón completo. Posteriormente los ventrículos fueron separados de las aurículas. El tejido ventricular fue congelado en nitrógeno líquido, triturado en un mortero y almacenado a -80 °C hasta su uso posterior.

Cultivo de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata

El aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de rata neonata fue realizado de acuerdo con lo descrito previamente²⁷. En breve, los animales fueron decapitados, se extrajo rápidamente los corazones y se procedió a la separación de aurículas y ventrículos. El tejido ventricular fue cortado previo a la digestión enzimática con pancreatina a una concentración de 0,1 g/100 mL en PBS 1X. Las células obtenidas de la digestión fueron incubadas en una placa de plástico durante 45 min en un ambiente de 5% CO₂ y 95% aire a 37 °C en presencia de medio de plaqueo (DMEM/M199 4:1, suero fetal bovino 10%, suero equino 5%, Penicilina:Estreptomina 100 unidades/mL:100 µg/mL, L-glutamina 200 mM, 5'-bromo-2'-desoxiuridina 100 µM) para separar los fibroblastos (adheridos al plástico) de los cardiomiocitos (sobrenadante). Los cardiomiocitos obtenidos fueron contados en una cámara de Neubauer y posteriormente se sembraron en placas previamente recubiertas con una monocapa de gelatina. El número por sembrar fue determinado de acuerdo a las condiciones experimentales y las placas se mantuvieron por 24 horas en medio de plaqueo. Posterior a las 24 horas de incubación, se realizó el lavado de las células con PBS 1X y estas se mantuvieron en medio de mantención (DMEM/M199 4:1, suero fetal bovino 10%, Penicilina:Estreptomina 100 unidades/mL:100 µg/mL y 5'-bromo-2'-desoxiuridina 100 µM) hasta realizar los experimentos correspondientes.

Transfecciones y transducciones de los cardiomiocitos neonatos en cultivo

Para disminuir la expresión de la PC1 o del factor transcripcional *c-Myc*, los cardiomiocitos fueron lipofectados con un siRNA con secuencia específica para los mismos, designados como siPC1 o si-c-Myc, respectivamente. En breve, los cardiomiocitos se transfectaron con 127 nM del siRNA correspondiente, en presencia de oligofectamina en medio Opti-MEM. Como control, se utilizó un siRNA de secuencia no relacionada. Los experimentos se terminaron a 24 y 48 h post transfección. La eficiencia de las transfecciones se muestra en las Figuras 11, 12 y 13 del Anexo.

Para sobreexpresar el C-terminal completo de la PC1 humana anclada a la membrana, fue utilizado el vector adenoviral Ad-FLM. Como control de la transducción se utilizó un adenovirus vacío Ad-Null. En breve, los cardiomiocitos se transdujeron con un MOI = 20 en medio de mantención. Los experimentos se terminaron a 24 y 48 h post transducción.

Inmunoblot

Extracción de proteínas

Para la obtención de un lisado total de proteínas, tanto de muestras provenientes de cardiomiocitos en cultivo como de tejido cardiaco ventricular, se utilizó el buffer de lisis comercial T-PER (*Tissue Protein Extraction Reagent*) suplementado con el cóctel inhibidor de proteasas (*cOmplete - Protease Inhibitor Cocktail Tablets*) y fosfatasas (*PhosSTOP – Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets*). Los lisados celulares obtenidos fueron centrifugados a 8.000 x g durante 8 minutos a 4 °C para la obtención de un sobrenadante al cual se le determinó la concentración de proteínas por medio del método de Bradford.

Cuantificación de la concentración de proteína

La cuantificación de las proteínas, tanto de muestras provenientes de cardiomiocitos en cultivo como de tejido cardiaco ventricular, fue realizada con el kit Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante. Se realizó una curva de calibración (Absorbancia vs. Concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) usando como estándar proteico Albúmina de Suero Bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA), siendo medida la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el lector de placa Sunrise (Tecan).

Electroforesis y detección de la señal quimioluminiscente

Los lisados proteicos obtenidos, fueron separados por medio de una electroforesis en gel de poli-acrilamida/bis-acrilamida con dodecilsulfato sódico en condiciones denaturantes, a través de un campo eléctrico (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad).

Posterior a la separación electroforética las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immobilon-P^{SO}, Milipore), la cual se bloqueó durante 1 h a t° ambiente con una solución de BSA o leche descremada en polvo (Non Fat Dry Milk, NFDM) 5% en TBS-Tween 0,2 % (TBST) y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario de interés (Tabla 1) a 4 °C toda la noche o 1 h a temperatura ambiente. La membrana se expuso a solución de lavado (TBST) y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario

conjugado a la peroxidasa del rábano. La señal quimioluminiscente fue detectada por el imager Chemidoc XRS System (Bio-Rad) o el imager C-DiGit Blot Scanner (LI-COR).

Análisis densitométrico y cuantificación de la señal quimioluminiscente

Se realizó un análisis densitométrico de las bandas correspondientes por medio del software ImageLab versión 6.0.1 (Bio-Rad). El contenido proteico se expresó como la razón de la señal densitométrica de la proteína de interés sobre la señal densitométrica del GAPDH (utilizado como control de carga).

Extracción de RNA y RT-qPCR

Extracción del RNA celular total

Para la obtención del RNA total, tanto de muestras provenientes de cardiomiocitos en cultivo como de tejido cardiaco ventricular, se realizó una extracción por medio del método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. En breve, se usó el reactivo TRIsure para obtener un lisado al cual se le adicionó cloroformo. Se centrifugaron las muestras a 12.000 x g por 12 minutos a 4 °C para la obtención de tres fases. Se obtuvo la capa superior acuosa y se precipitó el RNA total por medio de isopropanol a -80 °C durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g por 12 minutos a 4 °C para la obtención del pellet de RNA, el cual fue lavado con etanol al 75%.

Cuantificación del RNA celular total

La cuantificación del RNA, tanto de muestras provenientes de cardiomiocitos en cultivo como de tejido cardiaco ventricular, se realizó con el kit QuBit RNA HS Assay según las indicaciones del fabricante.

Síntesis de cDNA - Reacción de Transcripción Reversa

Se utilizó 150 ng de RNA de cada muestra para la reacción de Transcriptasa Reversa, usando el kit iScript cDNA synthesis (Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante. El DNA complementario (*complementary DNA*, cDNA) se diluyó 10 veces con H₂O libre de RNAsas y DNAsas.

qPCR

Para la semicuantificación del transcrito de *c-Myc*, *BIN1* y *18S rRNA* (utilizado como housekeeping), se usó el reactivo SYBR Green (Invitrogen) y partidores específicos

(Tabla 2). Las abundancias relativas de los transcritos fueron calculadas por medio del método del $\Delta\Delta C_t$.

Cálculo de las abundancias relativas de las isoformas de *BIN1*

Para detectar las isoformas de *BIN1* se generaron partidores específicos que unen los exones de interés (12 y 13, 17 y 18, 12 y 17, 12 y 18). El **ensayo A** usa la unión del exón 12 y 13 para detectar BIN1+13 y BIN1+13+17; el **ensayo B** usa la unión del exón 17 y 18 para detectar BIN1+17 y BIN1+13+17; el **ensayo C** usa la unión del exón 12 y 17 para detectar solamente BIN1+17 y el **ensayo D** usa la unión del exón 12 y 18 para detectar la variante más pequeña, BIN1. Los niveles de expresión de las isoformas cardio-específicas se derivan de la resta de los ensayos B-C, para obtener BIN1+13+17 y de la resta de los ensayos A-(B-C) para la obtención de BIN1+13, de acuerdo con lo descrito previamente¹⁰.

Análisis estadístico

Para la comparación de las medias de dos grupos experimentales se utilizó un t-Test no pareado, en tanto que, para la comparación de las medias de más de dos grupos experimentales, fue utilizado un ANOVA de una vía, seguido de un post test de Tukey. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a un valor $p < 0,05$. Los datos se analizaron y graficaron con el software GraphPad Prism versión 8.0.

Tabla 1.- Anticuerpos y condiciones experimentales utilizadas.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	AGENTE BLOQUEANTE	PROVEEDOR
Anti-c-Myc	1:1.000	BSA 5%/TBST 0,2%	Cell Signaling
Anti-GAPDH	1:40.000	BSA o NFDM 5%/TBST 0,2%	Sigma-Aldrich

Tabla 2.- Secuencia de partidores.

PARTIDOR	SECUENCIA (5' a 3')
c-Myc Forward	AGCCCCTAGTGCTGCATGA
c-Myc Reverse	TCCACAGACACCACATCAATTTC
BIN1 Total Forward	AGTGCGTCCAGAATTTCAAT
BIN1 Total Reverse	GCTTCGTGCATGGCTTTAAC
BIN1_12_13 Forward	CCATCTCAGCTCCGGAAAGG
BIN1_12_13 Reverse	TCTCAGGGACAAATGCGTCA
BIN1_17_18 Forward	GGAGACAGCAGCCAGTGAAG
BIN1_17_18 Reverse	CGCCATTACAGTTGCTGA
BIN1_12_17 Forward	AAAGGGAACAAGAGCCCTTC
BIN1_12_17 Reverse	TTCACTGGCTGCTGTCTCC
BIN1_12_18 Forward	GGGCTACCAT CCCCAAGTCC

BIN1_12_18 Reverse	CGCCATTACAGTTGCTGAG
18S rRNA Forward	CGGACAGGATTGACAGATTG
18S rRNA Reverse	CAAATCGCTCCACCAACTAA

RESULTADOS

1. La expresión deficiente de la Policistina-1 (PC1) produce un aumento de la expresión del factor transcripcional *c-Myc*

Para determinar si la PC1 está implicada en la regulación de la expresión de *c-Myc*, se estudiaron los niveles proteicos de este factor transcripcional por medio de inmunoblot, en muestras de cardiomiocitos knockdown para la PC1 (siPC1) y en muestras de tejido ventricular de ratones PC1 KO. Los niveles del mRNA de la PC1 en los cardiomiocitos transfectados se muestran en la Figura 11 del anexo.

Nuestros resultados indican que mientras los cardiomiocitos siPC1 presentan un aumento en los niveles proteicos de *c-Myc*, no se aprecian cambios estadísticamente significativos en los animales PC1 KO de tres meses (Figura 2A y B, respectivamente). Por otra parte, los niveles proteicos de *c-Myc* aumentan en ratones PC1 KO de 5 y 7 meses (Figura D y E del anexo).

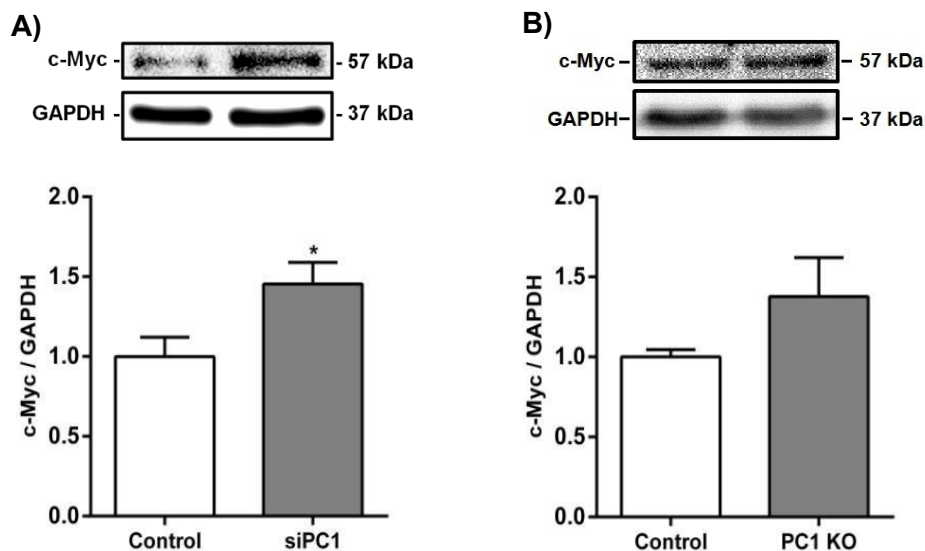


Figura 2.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles proteicos de c-Myc. Niveles proteicos de c-Myc en: **A)** cardiomiocitos de rata neonata transfectados (siPC1) durante 24 h (n = 5) y **B)** tejido cardiaco ventricular de ratones PC1 KO de 3 meses (n = 6). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * p<0,05 vs. Control.

Para determinar si la regulación positiva de los niveles proteicos de c-Myc es dependiente de cambios en los niveles de mRNA, se cuantificó la abundancia relativa de su transcrito por medio de RT-qPCR.

Nuestros resultados indican que los cardiomiocitos siPC1 presentan un aumento en los niveles del transcrito de *c-Myc*. Por otra parte, no se aprecian cambios estadísticamente significativos en el tejido cardiaco de los animales PC1 KO (Figura 3A y B, respectivamente).

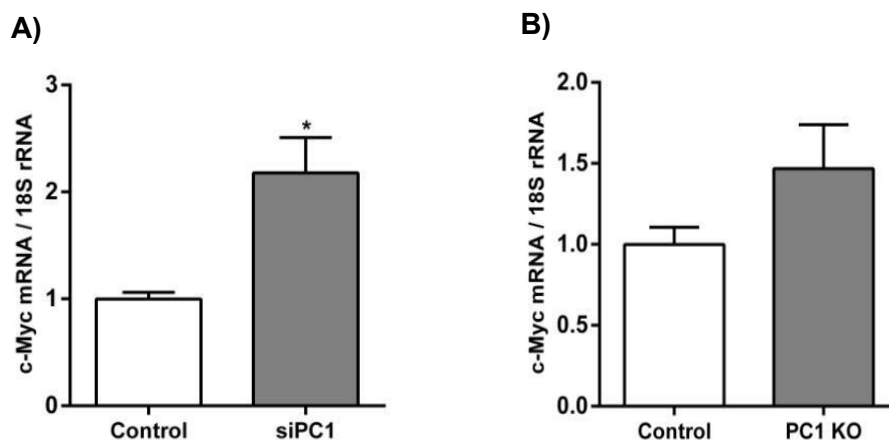


Figura 3.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles del transcrito de c-Myc. Niveles del transcrito de *c-Myc* en: **A)** cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (siPC1) durante 24 h (n = 9-11) y **B)** tejido cardiaco ventricular de ratones PC1 KO de 3 meses (n = 9). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * p<0,05 vs. Control.

2. La sobreexpresión de la cola C-terminal de la PC1 (PC1-CTT) produce una regulación negativa del factor transcripcional c-Myc

Para corroborar si la PC1 pudiera funcionar como un supresor de la expresión de c-Myc, cardiomiocitos neonatos en cultivo se transdujeron con un adenovirus para sobreexpresar la cola C-terminal de la PC1 (Ad-FLM) y se estudiaron los cambios en los

niveles proteicos y de mRNA de *c-Myc*. La sobreexpresión de la cola C-terminal de la PC1 bajo las condiciones utilizadas ha sido previamente reportada por nuestro laboratorio²⁸.

Se realizó un pool de controles tanto a 24 como a 48 h para realizar la comparación entre grupos experimentales. Nuestros resultados indican que los cardiomiocitos que sobreexpresan la cola C-terminal de la PC1, presentan una tendencia a la disminución de los niveles proteicos de *c-Myc* 24 h post transducción, la que se vuelve significativa a las 48 h (Figura 4A). No se observaron cambios en los niveles del mRNA de *c-Myc* a las 24 h post transducción (Figura 4B). No se realizaron medidas del mRNA a las 48 h post transducción.

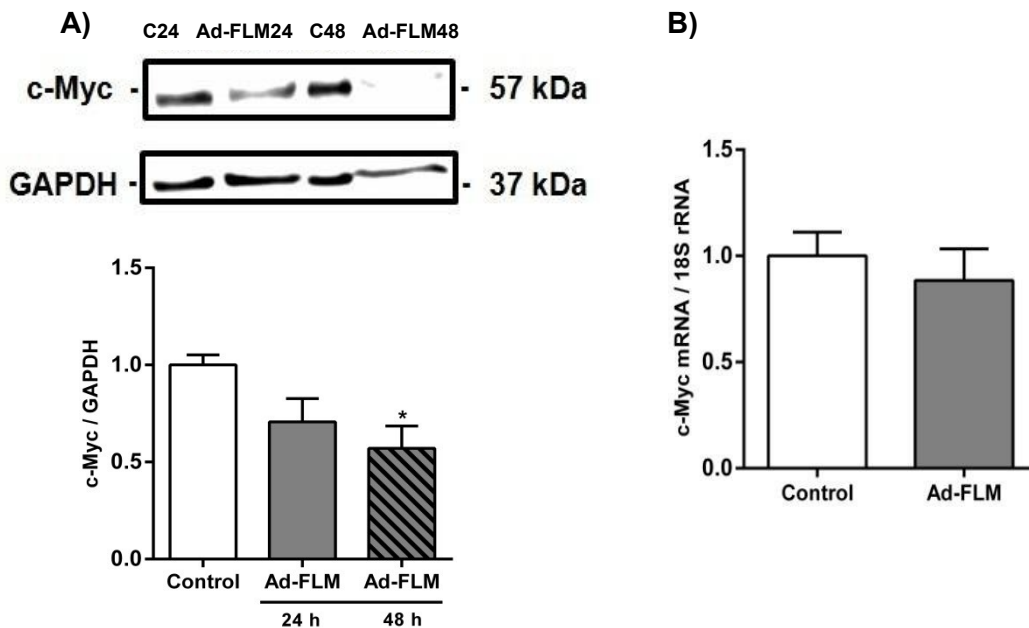


Figura 4.- Efecto de la sobreexpresión de PC1-CTT sobre los niveles proteicos y del transcrito de *c-Myc*. **A)** Niveles proteicos de *c-Myc* en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transducidos (Ad-FLM) durante 24 h y 48 h (n = 5). **B)** Niveles del transcrito de *c-Myc* en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transducidos (Ad-FLM) durante 24 h (n = 5). Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un post test de Tukey o un t-Test no pareado, según correspondiere. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Control.

Estos resultados en su conjunto sugieren que la PC1 actúa como un supresor de la expresión de *c-Myc* en los cardiomiocitos.

3. La expresión deficiente de c-Myc modula la expresión de las isoformas de *BIN1*

Para determinar si c-Myc pudiese regular la expresión de *BIN1*, se estudiaron los cambios del mRNA total de *BIN1* por medio de RT-qPCR en cardiomiocitos knockdown para c-Myc (sic-Myc). En las Figuras 12 y 13 de la sección Anexos, se muestran los niveles de mRNA y proteína de c-Myc en los cardiomiocitos lipofectados.

Nuestros resultados indican que los cardiomiocitos sic-Myc no presentan un cambio en los niveles totales de mRNA de *BIN1* (Figura 5).

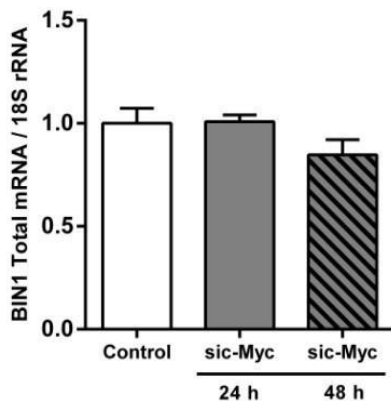


Figura 5.- Efecto de la deficiencia de c-Myc sobre los niveles totales del transcrito de *BIN1*. Niveles totales del mRNA de *BIN1* en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (sic-Myc) durante 24 y 48 h (n = 4-5). Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía seguido de un post test de Tukey. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Considerando que c-Myc también es un regulador del proceso de splicing alternativo, determinamos si este factor transcripcional podría modular la expresión de las isoformas de *BIN1*. Para ello se determinaron los niveles de los transcritos de las formas ubicuas de *BIN1* (*BIN1* y *BIN1+17*) y de las formas específicas de tejido cardíaco (*BIN1+13* y *BIN1+13+17*).

Nuestros resultados muestran que los cardiomiocitos sic-Myc no presentan cambios en el contenido de mRNA de la isoforma pequeña *BIN1* (Figura 6A); sin embargo, presentan una disminución en los niveles del transcrito de *BIN1+17*, a partir de las 24 h de transfección (Figura 6B). En cuanto a las isoformas cardio-específicas, mientras se aprecia un aumento de los niveles del transcrito de *BIN1+13* a las 48 h post transfección (Figura 6C), se observa una disminución del mRNA de *BIN1+13+17* desde las 24 h post transfección (Figura 6D).

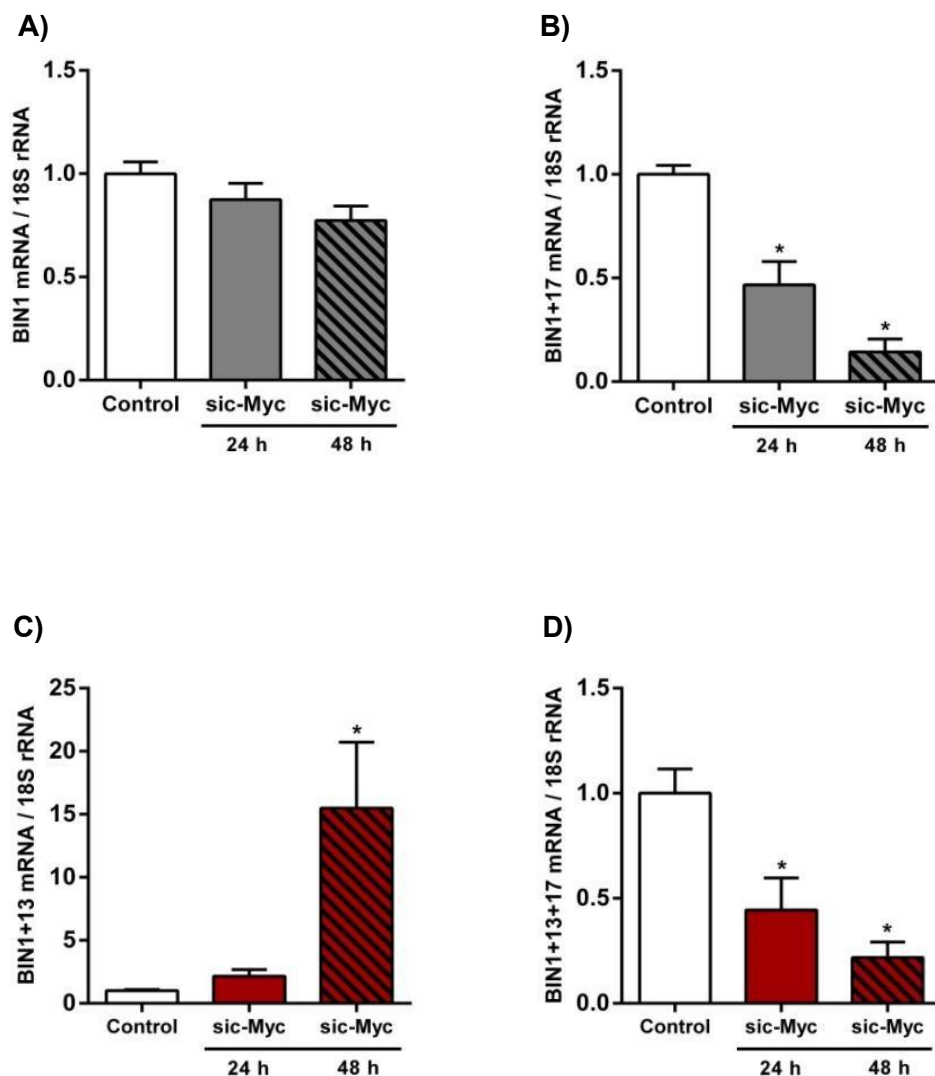


Figura 6.- Efecto de la deficiencia de c-Myc sobre los niveles de los transcritos de las isoformas de *BIN1*. Niveles del transcrito de las isoformas ubicuas: **A)** BIN1 (n = 4-5) y **B)** BIN1+17 (n = 4-5) y de las isoformas cardio-específicas: **C)** BIN1+13 (n = 3-5) y **D)** BIN1+13+17 (n = 4-5) en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (sic-Myc) durante 24 h y 48 h. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un post test de Tukey. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * p<0,05 vs. Control.

El conjunto de estos resultados sugiere que c-Myc es capaz de modular la distribución de las isoformas de *BIN1* en los cardiomiocitos, sin alterar los niveles totales del mRNA del gen.

4. La expresión deficiente de PC1 modula la expresión de las isoformas de *BIN1*

Para determinar si la PC1 pudiere modular la expresión de *BIN1*, se estudiaron los cambios del mRNA total de *BIN1* por medio de RT-qPCR en cardiomiocitos knockdown para PC1 (siPC1). Nuestros resultados indican que los cardiomiocitos siPC1 no presentan cambios en los niveles totales de mRNA de *BIN1* a las 24 h post transfección (Figura 7). No se realizaron detecciones de *BIN1* a tiempos más largos de transfección; sin embargo, esto podría representar una limitante en cuanto al tiempo requerido para observar cambios en los transcritos del gen *BIN1*.

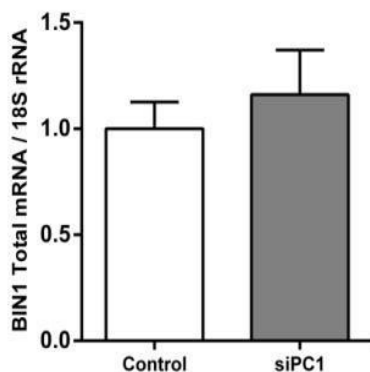


Figura 7.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles totales del transcrito de *BIN1*. Niveles totales del mRNA de *BIN1* en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (siPC1) durante 24 h (n = 7). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

Para determinar si la PC1 regula la expresión de las isoformas de *BIN1*, se determinaron los niveles de los transcritos tanto de las isoformas ubicuas como de las isoformas específicas de tejido cardiaco 24 h post transfección con un siRNA para PC1 (siPC1).

Nuestros resultados indican que los cardiomiocitos siPC1 no presentan cambios en los niveles del transcrito de *BIN1* ni *BIN+17* (Figura 8A y B, respectivamente). En cuanto a las isoformas cardio-específicas, a pesar de observarse una tendencia al aumento de los niveles de la isoforma *BIN1+13*, no se aprecian diferencias significativas (Figura 8C). Por

último, la disminución de la PC1 en los cardiomiocitos se relaciona a una disminución de los niveles de la isoforma BIN1+13+17 (Figura 8D) con respecto al grupo control.

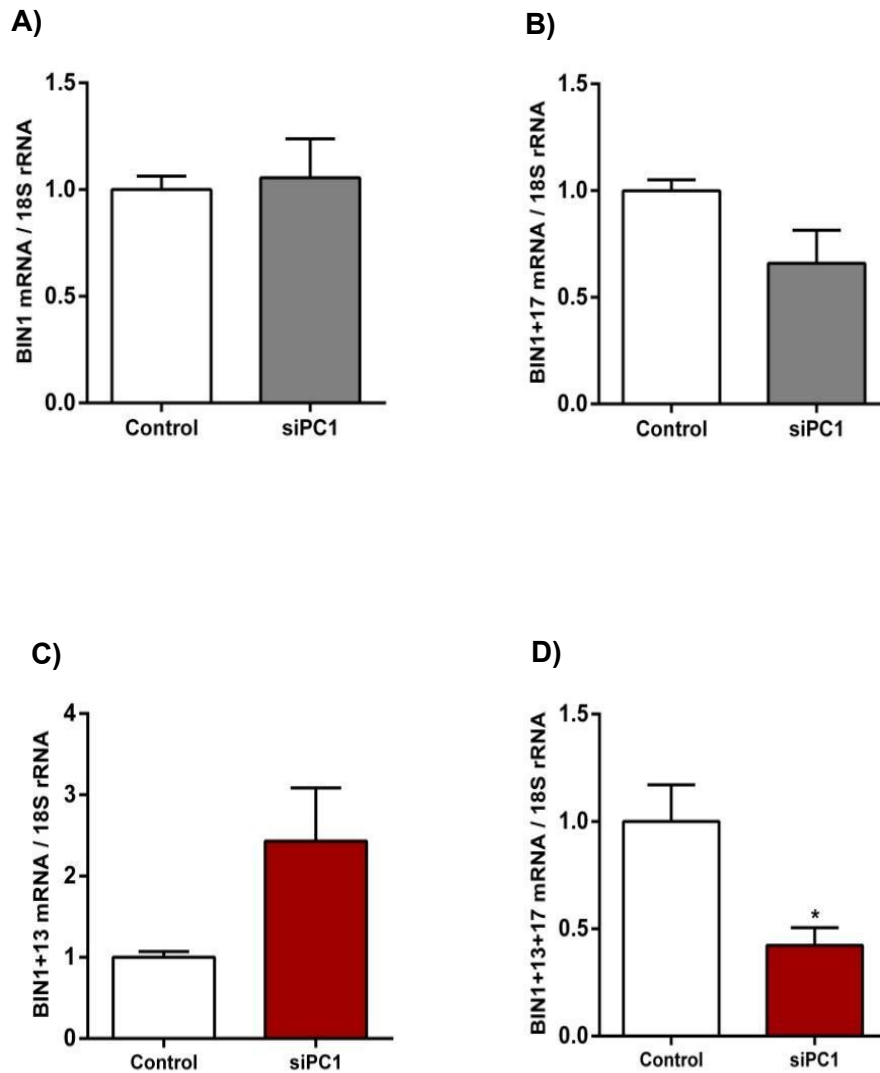


Figura 8.- Efecto de la disminución de la PC1 en los cardiomiocitos sobre los niveles de los transcritos de las isoformas de *BIN1*. Niveles del transcrito de las isoformas ubicuas: **A)** BIN1 (n = 8) y **B)** BIN1+17 (n = 4) y de las isoformas cardio-específicas: **C)** BIN1+13 (n = 3) y **D)** BIN1+13+17 (n = 3), en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (siPC1) durante

24 h. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Control.

5. La sobreexpresión de PC1-CTT modula la expresión de las isoformas de *BIN1*

Para corroborar si la PC1 modula positivamente la expresión de *BIN1*, se estudiaron los cambios del mRNA total de *BIN1* por medio de RT-qPCR en cardiomiocitos que sobreexpresan la cola C-terminal de la PC1 (Ad-FLM). Nuestros resultados indican que 24 h post transducción con el adenovirus, los cardiomiocitos no presentan cambios en los niveles totales de mRNA de *BIN1* (Figura 9).

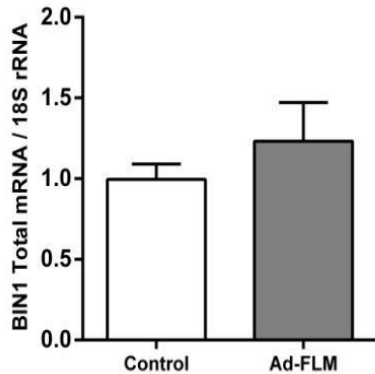
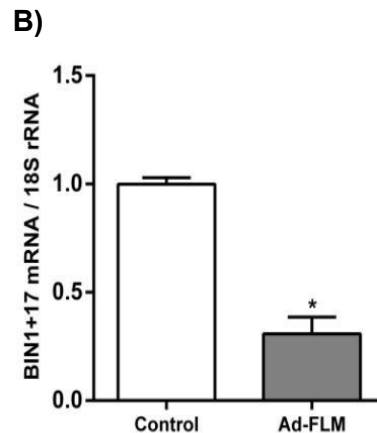
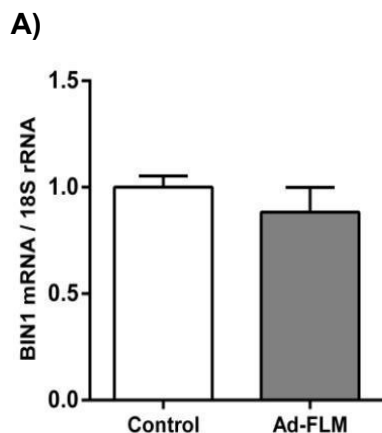


Figura 9.- Efecto de la sobreexpresión de la PC1-CTT sobre los niveles totales del transcrito de *BIN1*. Niveles totales del mRNA de *BIN1* en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transducidos (Ad-FLM) durante 24 h (n = 5). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM.

En cuanto al contenido de mRNA de las isoformas de *BIN1*, nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de la cola C-terminal de la PC1 no induce cambios en los niveles de la isoforma ubicua *BIN1*, pero sí promueve la disminución de los niveles del transcrito *BIN1+17* (Figura 10A y B, respectivamente). Con respecto a las isoformas cardio-específicas, se aprecia un aumento de los niveles del transcrito *BIN1+13* y una disminución de los niveles *BIN1+13+17* (Figura 10C y D, respectivamente).



C)

D)

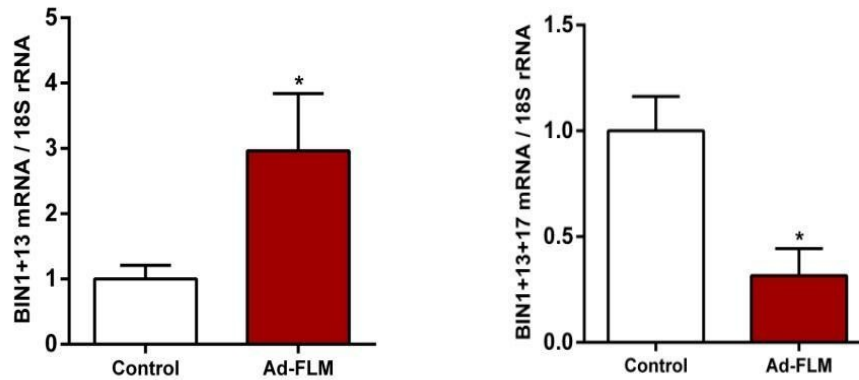


Figura 10.- Efecto de la sobreexpresión de PC1-CTT sobre los niveles de los transcritos de las isoformas de *BIN1*. Niveles del transcrito de las isoformas ubicuas de: **A)** BIN1 (n = 5) y **B)** BIN1+17 (n = 4), y las isoformas cardio-específicas: **C)** BIN1+13 (n = 3-5) y **D)** BIN1+13+17 (n = 4), en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transducidos (Ad-FLM) durante 24 h. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * p<0,05 vs. Control.

Estos resultados en su conjunto son sugerentes de que la PC1 es capaz de modular la distribución de las isoformas de *BIN1* en los cardiomiocitos sin alterar los niveles totales del mRNA de este gen.

Tabla 3.- Resumen de resultados obtenidos en las diferentes condiciones experimentales.

Condición	Proteína		mRNA isoformas			
	c-Myc	c-Myc	BIN1	BIN1+17	BIN1+13	BIN1+13+17
siPC1	↑	↑	=	↓	↑	↓
PC1-CTT	↓	=	=	=	=	↓
PC1 KO 3 meses	=	=	=	↓	↑	↓
PC1 KO 5 meses	?	↑				
PC1 KO 7 meses	?	↑				

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó el papel de la proteína Policistina-1 (PC1) en los cardiomiocitos, como un regulador tanto de la expresión de *c-Myc* como de *BIN1*. Se postuló que la PC1 podría actuar como un regulador positivo de *BIN1* por medio de la supresión de *c-Myc*. El conjunto de nuestros datos sugiere que: a) la PC1 es un regulador negativo de la expresión de *c-Myc* en cardiomiocitos de rata neonata y en corazones de ratones de 5 y 7 meses, b) *c-Myc* es capaz de modular la expresión diferencial de las isoformas de *BIN1*, c) los cambios en los niveles de expresión de la PC1 regulan de manera diferencial la expresión de las isoformas de *BIN1*, semejante a la expresión regulada por *c-Myc*.

PC1 como supresor de c-Myc

La PC1 es una proteína integral de membrana con capacidad de regular diferentes factores de transcripción y vías de señalización. Previamente se ha descrito que la PC1 suprime al factor transcripcional *c-Myc* en células de la musculatura lisa vascular, lo cual previene el cambio fenotípico de estas células, de contráctiles a secretoras durante la

disección aortica⁴³. Se ha demostrado además que el dominio C-terminal de la PC1 es capaz de sufrir al menos dos cortes proteolíticos, generándose fragmentos que translocan al núcleo y ejercen regulación transcripcional directa al unirse físicamente con factores transcripcionales: un fragmento de ~17 kDa interactúa con STAT3, STAT6 y el coactivador p100, mientras otro fragmento de ~35 kDa previene interacciones entre TCF y CHOP con el coactivador p300⁴⁴. Más aún, la sobreexpresión de la cola C-terminal de la PC1 puede actuar directamente sobre STAT3⁴⁵ o vía fragmentos solubles que translocan al núcleo.

Nuestros datos indican que la disminución de la expresión de la PC1 en los cardiomiocitos neonatos es un estímulo que induce un aumento tanto de los niveles proteicos como del transcrito de *c-Myc*, sugiriendo que la regulación positiva de *c-Myc* es dependiente del contenido de su mRNA. Se aprecia, además, una tendencia al aumento de la expresión de *c-Myc* en los ratones PC1 KO, sin que estos cambios sean estadísticamente significativos. Aun así, el transcrito de *c-Myc* está aumentado en tejido cardíaco ventricular de ratones PC1 KO adultos de 5 y 7 meses (Figura 14 y 15), lo cual sugiere que la proteína *c-Myc* podría estar relacionada con el progreso de la pérdida de la función cardíaca que presenta este modelo murino, lo anterior se ha evidenciado en modelos adultos de hipertrofia cardíaca, en donde *c-Myc* es un agente capaz de producir un aumento del tamaño del cardiomiocito y cambios a nivel de expresión génica³⁵.

Además de lo anterior, la sobreexpresión de la cola C-terminal de la PC1 redujo los niveles proteicos de *c-Myc*, confirmando el papel de la PC1 en la regulación negativa de la expresión de este factor transcripcional.

Si bien hasta el momento no se encuentra descrito la vía a través de la cual la PC1 podría regular la expresión de *c-Myc*, se encuentra reportado que el C-terminal de la PC1 posee un sitio de unión a proteína G⁴⁶, la cual es sumamente importante en la señalización de este mecanosensor, por lo que la supresión de *c-Myc* podría deberse a una vía transduccional dependiente de esta proteína G. Por otra parte, la Policistina-1 es capaz de inhibir la vía Wnt/ β -catenina^{19, 20}, la cual tiene como sustrato río abajo a *c-Myc*, por medio de la interacción de la cola C-terminal a nivel de la proteína TCF, evitándose de esta manera la activación de β -catenina por medio del coactivador TCF y la consiguiente elevación tanto de los niveles proteicos como del transcrito de *c-Myc*. Actualmente se desconoce si la activación de la vía Wnt/ β -catenina por medio de PC1 depende de la activación de una proteína G trimérica.

El conjunto de nuestros datos sugiere que la PC1 funciona como un supresor de *c-Myc* en los cardiomiocitos y que la supresión es al menos en parte, ejercida por la cola C-terminal de la PC1. Estos resultados están en concordancia con la literatura, en la cual se ha descrito ampliamente que en células renales la PC1 es un supresor de *c-Myc*, tanto en modelos murinos de ADPKD, como en tejido renal quístico de pacientes humanos con mutación del gen *PKD1*^{37, 38, 39}.

c-Myc como modulador del splicing de *BIN1*

c-Myc es un conocido factor transcripcional implicado en la pérdida de la diferenciación, en el crecimiento celular, en la proliferación y en la apoptosis, y en este contexto, se ha evidenciado que este factor transcripcional posee la capacidad de interactuar con la proteína *BIN1*^{29, 41, 42}.

Nuestros resultados indican que si bien los cardiomiocitos knockdown para *c-Myc* no presentan cambios en los niveles totales del mRNA de *BIN1*, sí presentan cambios en la distribución de algunas isoformas de esta proteína, en particular, la regulación negativa de *c-Myc* produce una disminución de los transcritos de *BIN1+17* y *BIN1+13+17* y una regulación positiva de *BIN1+13*, sin apreciarse cambios en la isoforma más pequeña, *BIN1*. Estos datos sugieren que *c-Myc* podría actuar como un regulador del splicing de *BIN1* en los cardiomiocitos.

En la literatura reciente se ha descrito que *c-Myc* posee la capacidad de regular proteínas involucradas en la maquinaria del splicing en células cancerosas, lo cual regula la expresión de genes como *PKM1* y *PKM2*, afectando la razón de sus productos celulares Piruvato Kinasa 1 y Piruvato Kinasa 2⁴⁷. Por otra parte, en el modelo de ratones E μ -*Myc*, *c-Myc* facilita el splicing mediante la regulación positiva de la proteína arginina N-metiltransferasa 5, la cual metila al factor de empalme rico en serina/arginina 1, proteína encargada de la regulación del splicing⁴⁸. Además de este regulador, *c-Myc* induce directamente la expresión de otros factores de empalme alternativos como la proteína tirosina fosfatasa- β y la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1/A2, factores que median el potencial oncogénico de *c-Myc*^{47, 49}.

En su conjunto estos hallazgos demuestran que *c-Myc* regula varias proteínas involucradas en el splicing, por lo tanto, podría afectar también la maduración de *BIN1*, como sugieren nuestros resultados.

Policistina-1 como regulador del splicing de *BIN1*

La PC1 es una proteína mecanosensora clave para la fisiología cardíaca^{27, 28}. Previamente se ha demostrado que esto podría deberse, aunque sea en parte, a que la PC1 es necesaria para mantener los niveles proteicos fisiológicos del LTCC, clave para la contractilidad cardíaca^{2 - 4}. Considerando que para evitar la degradación de este canal es crucial la correcta formación de los túbulos-T y que ésta depende principalmente de la expresión de *BIN1*, en esta tesis se planteó estudiar si la PC1 era capaz de modular a nivel transcripcional el gen *BIN1* en los cardiomiocitos.

Mientras en el modelo de ratones PC1 KO (9-12 semanas de vida) se observa una disminución del contenido total de *BIN1* en el tejido cardíaco (resultados no mostrados y no publicados), los cardiomiocitos knockdown para PC1 no presentan cambios en la cantidad total del mRNA de *BIN1*. Esto podría deberse tanto a la eficiencia de la transfección, como a los tiempos empleados para medir los cambios posteriores a la técnica. A pesar de lo anterior, nuestros datos mostraron una disminución del transcrito de *BIN1*+13+17, sin cambios estadísticamente significativos en las otras isoformas de *BIN1*. Sorprendentemente, estos cambios en la distribución de las isoformas de *BIN1*, son similares a los encontrados en los cardiomiocitos que sobreexpresan la cola C-terminal de la PC1. Esto podría deberse a que un desbalance del contenido fisiológico de la PC1 ya sea por un aumento o una disminución de su expresión, puede derivar en el mismo efecto río abajo.

De hecho, en el contexto de la ADPKD se postula que existe un rango óptimo del contenido de las proteínas PC1 y PC2, que permiten una regulación estequiométrica correcta, por tanto, la disminución de PC1, así como su aumento podrían regular las mismas vías de señalización, concluyendo este fenómeno en la citogénesis característica de esta enfermedad^{50, 51}.

Por último, es de notar que ya sea disminuyendo la expresión de c-Myc o PC1 con un siRNA o sobreexpresando el C-terminal de la PC1, se observa una disminución de la isoforma *BIN1*+13+17, la cual es una de las principales isoformas implicadas directamente en la formación de los túbulos-T y de los microplegamientos que determinan su ultraestructura y la cual, es fundamental para la correcta contracción de los cardiomiocitos. Esto podría sugerir, por tanto, el papel crucial que la PC1 podría tener en la formación de los túbulos-T.

En este trabajo se ha demostrado que tanto la regulación negativa de PC1 o la regulación positiva de la cola C-terminal de la misma, modulan la distribución de las

isoformas de *BIN1*. Por otra parte, la regulación negativa de *c-Myc* también produce el mismo efecto sobre el gen *BIN1*, sugiriendo que estas moléculas se encuentran relacionadas en la respuesta celular observada.

CONCLUSIONES

- La Policistina-1 puede actuar como un supresor de *c-Myc* en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo, regulando negativamente tanto los niveles proteicos como del transcrito de este factor transcripcional.
- *c-Myc* modula la expresión diferencial de las isoformas de *BIN1* en los cardiomiocitos de rata neonata en cultivo, sin producir cambios en los niveles totales del transcrito.
- La Policistina-1 puede modular la expresión diferencial de las isoformas de *BIN1* en los cardiomiocitos de rata neonata en cultivo, sin producir cambios en los niveles totales del transcrito. Este efecto es producto del desbalance fisiológico de este mecanosensor, es decir, tanto su regulación negativa como positiva podrían producir este efecto sobre *BIN1*.
- La PC1 regula la expresión de las isoformas de *BIN1* a través, aunque sea en parte, de la regulación negativa del factor transcripcional *c-Myc*.

PROYECCIONES

- Realizar estudios para determinar la relación de *c-Myc* con el progreso de la patología cardíaca en ratones PC1 KO. Para ello se propone cuantificar los niveles proteicos de *c-Myc* en ratones de 5 y 7 meses. Se espera observar una relación entre los niveles de expresión de *c-Myc* y el progreso de la insuficiencia cardíaca en los ratones PC1 KO.
- Estudiar si la regulación del nivel proteico de BIN1 depende de la regulación del nivel de mRNA, para lo que se propone cuantificar los niveles proteicos de BIN1 en células transfectadas (siPC1 y sic-Myc) y células transducidas con la cola C-terminal de la PC1 (Ad-FLM).
- Determinar si el mecanismo molecular por el cual la PC1 ejerce supresión de la expresión de *c-Myc* requiere del sitio de unión a proteína G trimérica de la misma. Para ello se propone sobreexpresar el C-terminal de la PC1 mutado en el sitio de reconocimiento de Proteína G, por medio de un vector adenoviral, de esta manera se podrá determinar si la supresión de *c-Myc* por medio de PC1 esta mediada por una Proteína G o si es independiente de la

misma. Además, se propone realizar una inmunoprecipitación con un inmunoblot posterior para determinar si PC1-CTT puede interactuar físicamente con c-Myc.

- Esclarecer si el desbalance de los niveles proteicos de c-Myc está involucrado en la modulación de las isoformas de *BIN1*, por lo que se propone la sobreexpresión de c-Myc por medio de un vector adenoviral, para cuantificar las isoformas de *BIN1*.

ANEXO

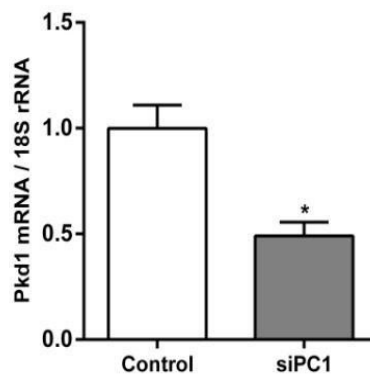


Figura A.- Niveles de mRNA del gen de la PC1 en cardiomiocitos knockdown para PC1. Niveles del transcrito de *Pkd1* en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (siPC1) durante 24 h (n = 7-10). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Control.

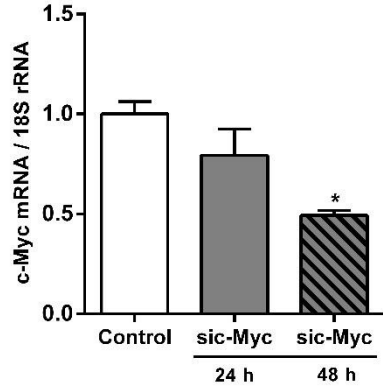


Figura B.- Niveles del contenido de mRNA de *c-Myc* en cardiomiocitos knockdown para dicho factor transcripcional. Niveles del transcrito de *c-Myc* en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (sic-Myc) durante 24 y 48 h (n = 5). Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía seguido de un post test de Tukey. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * p<0,05 vs. Control.

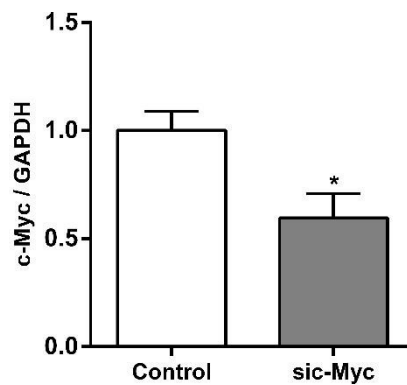


Figura C.- Niveles proteicos de *c-Myc* en cardiomiocitos knockdown para dicho factor transcripcional. Niveles proteicos de *c-Myc* en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (sic-Myc) durante 24 h (n = 4). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM; * p<0,05 vs. Control.

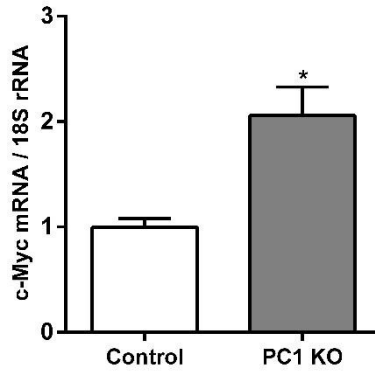


Figura D.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles del transcrito de *c-Myc* en ratones PC1 KO de 5 meses de edad. Niveles del transcrito de *c-Myc* en tejido cardiaco ventricular (n = 3). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM; * p<0,05 vs. Control.

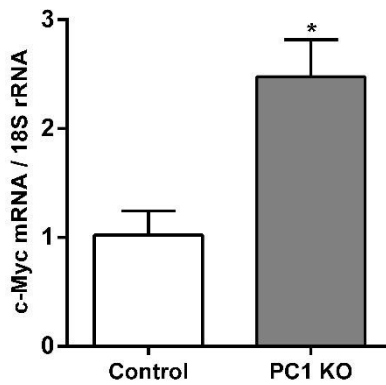


Figura E.- Efecto de la deficiencia de PC1 sobre los niveles del transcrito de *c-Myc* en ratones PC1 KO de 7 meses de edad. Niveles del transcrito de *c-Myc* en tejido cardiaco ventricular (n = 9-12). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM; * p<0,05 vs. Control.

REFERENCIAS

- 1.- Nabeebaccus, A., Shah, A. M. Biochemistry and physiology of cardiac muscle. *Medicine* **46**, 431–436 (2018).
- 2.- Bers, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* **415**, 198–205 (2002).
- 3.- Asghari, P., Scriven, D. R. L., Hoskins, J., Fameli, N., van Breeman, C., Moore, E. D. W. The structure and functioning of the couplon in the mammalian cardiomyocyte. *Protoplasma* **249**, 31–38 (2012).
- 4.- Marks, A. R. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *Journal of Clinical Investigation* **123**, 46–52 (2013).
- 5.- Ibrahim, M., Gorelik, J., Yacoub, M. H., Terracciano, C. M. The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**, 2714–2723 (2011).
- 6.- Brette, F., Orchard, C. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circulation Research* **92**, 1182–1192 (2003).

- 7.- Hong, T., Shaw, R. M. Cardiac t-tubule microanatomy and function. *Physiological Reviews* **97**, 227–252 (2017).
- 8.- Manfra, O., Frisk, M., Louch, W. E. Regulation of cardiomyocyte t-tubular structure: opportunities for therapy. *Current Heart Failure Reports* **14**, 167–178 (2017).
- 9.- Prokic, I., Cowling, B. S., Laporte, J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *Journal of Molecular Medicine* **92**, 453–463 (2014).
- 10.- Hong, T., Yang, H., Zhang, S., Cho, H., Kalashnikova, M., Sun, B., Zhang, H., Bhargava, A., Grabe, M., Olgin, J., Gorelik, J., Marbán, E., Jan, L., Shaw, R. Cardiac BIN1 folds T-tubule membrane, controlling ion flux and limiting arrhythmia. *Nature Medicine* **20**, 624–632 (2014).
- 11.- De La Mata, A., Tajada, S., O'Dwyer, S., Matsumoto, C., Dixon, R. E., Hariaran, N., Moreno, C. M., Santana, L. F. BIN1 Induces the Formation of T-Tubules and Adult-Like Ca²⁺ Release Units in Developing Cardiomyocytes: BIN1 Promotes hESC-CMs with Ventricular Phenotype. *Stem Cells* **37**, 54–64 (2019).
- 12.- Hong, T. T., Smyth, J. W., Gao, D., Chu, K. Y., Vogan, J. M., Fong, T. S., Jensen, B. C., Colecraft, H. M., Shaw, R. M. BIN1 Localizes the L-Type Calcium Channel to Cardiac T-Tubules. *PLoS Biology* **8**, e1000312 (2010).
- 13.- Hong, T., Smyth, J. W., Chu, K. Y., Vogan, J. M., Fong, T. S., Jensen, B. C., Fang, K., Halushka, M. K., Russell, S. D., Colecraft, H., Hoopes, C. W., Ocorr, K., Chi, N. C., Shaw, R. M. BIN1 is reduced and Cav1.2 trafficking is impaired in human failing cardiomyocytes. *Heart Rhythm* **9**, 812–820 (2012).
- 14.- Peters, D. J., van de Wal, A., Spruit, L., Saris, J. J., Breuning, M. H., Bruijn, J. A., de Heer, E. Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *The Journal of Pathology* **188**, 439–446 (1999).
- 15.- Ong, A. C. M., Harris, P. C. Molecular pathogenesis of ADPKD: The polycystin complex gets complex. *Kidney International* **67**, 1234–1247 (2005).
- 16.- Hughes, J., Ward, C. J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millán, J. L., Gamble, V., Harris, P. C. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nature Genetics* **10**, 151–160 (1995).

- 17.-** Li, H. P., Geng, L., Burrow, C. R., Wilson, P. D. Identification of Phosphorylation Sites in the PKD1-Encoded Protein C-Terminal Domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **259**, 356–363 (1999).
- 18.-** Low, S. H., Vasanth, S., Larson, C. H., Mukherjee, S., Sharma, N., Kinter, M. T., Kane, M. E., Obara, T., Weimbs, T. Polycystin-1, STAT6, and P100 Function in a Pathway that Transduces Ciliary Mechanosensation and Is Activated in Polycystic Kidney Disease. *Developmental Cell* **10**, 57–69 (2006).
- 19.-** Lal, M., Song, X., Pluznick, J. L., Di Giovanni, V., Merrick, D. M., Rosenblum, N. D., Chauvet, V., Gottardi, C. J., Pei, Y., Caplan, M. J. Polycystin-1 C-terminal tail associates with β -catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Human Molecular Genetics* **17**, 3105–3117 (2008).
- 20.-** Merrick, D., Chapin, H., Baggs, J. E., Yu, Z., Somlo, S., Sun, Z., Hogenesch, J. B., Caplan, M. J. The γ -Secretase Cleavage Product of Polycystin-1 Regulates TCF and CHOP-Mediated Transcriptional Activation through a p300-Dependent Mechanism. *Developmental Cell* **22**, 197–210 (2012).
- 21.-** Dalagiorgou, G., Basdra, E. K., Papavassiliou, A. G. Polycystin-1: Function as a mechanosensor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **42**, 1610–1613 (2010).
- 22.-** Lemos, F. O., Ehrlich, B. E. Polycystin and calcium signaling in cell death and survival. *Cell Calcium* **69**, 37–45 (2018).
- 23.-** Retailleau, K., Duprat, F. Polycystins and partners: proposed role in mechanosensitivity: Mechanosensitivity of polycystins and partners. *Journal of Physiology* **592**, 2453–2471 (2014).
- 24.-** Chauvet, V., Tian, X., Husson, H., Grimm, D. H., Wang, T., Hiesberger, T., Igarashi, P., Bennett, A. M., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Somlo, S., Caplan, M. J. Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *Journal of Clinical Investigation* **114**, 1433–1443 (2004).
- 25.-** 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. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics* **33**, 129–137 (2003).

- 26.-** Nauli, S. M., Zhou, J. Polycystins and mechanosensation in renal and nodal cilia. *Bioessays* **26**, 844–856 (2004).
- 27.-** Pedrozo, Z., Criollo, A., Battiprolu, P. K., Morales, C. R., Contreras, A., Fernández, C., Jiang, N., Luo, X., Caplan, M. J., Somlo, S., Rothermel, B. A., Gillette, T. G., Lavandero, S., Hill, J. A. Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca²⁺ Channel Protein Stability. *Circulation Research* **131**, 2131–2142 (2015).
- 28.-** Córdova-Casanova, A., Olmedo, I., Riquelme, J. A., Barrientos, G., Sánchez, G., Gillette, T. G., Lavandero, S., Chiong, M., Donoso, P., Pedrozo, Z. Mechanical stretch increases L-type calcium channel stability in cardiomyocytes through a polycystin-1/AKT-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1865**, 289–296 (2018).
- 29.-** Pyndiah, S., Tanida, S., Ahmed, K. M., Cassimere, E. K., Choe, C., Sakamuro, D. c-MYC Suppresses BIN1 to Release Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1: A Mechanism by Which Cancer Cells Acquire Cisplatin Resistance. *Science Signaling* **4**, ra19-ra19 (2011).
- 30.-** Dang, C. V. c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1–11 (1999).
- 31.-** Adhikary, S., Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 635–645 (2005).
- 32.-** Pelengaris, S., Khan, M., Evan, G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer* **2**, 764–776 (2002).
- 33.-** Blackwood, E., Eisenman, R. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**, 1211–1217 (1991).
- 34.-** Wasylishen, A. R., Penn, L. Z. Myc: The Beauty and the Beast. *Genes & Cancer* **1**, 532–541 (2010).
- 35.-** Napoli, C., Lermant, L. O., de Nigris, F., Sica, V. c-Myc Oncoprotein: A Dual Pathogenic Role in Neoplasia and Cardiovascular Diseases?. *Neoplasia* **4**, 185–190 (2002).
- 36.-** Yamazaki, T., Komuro, I., Yazaki, Y. Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **27**, 133–140 (1995).

- 37.-** Harding, M. A., Gattone, V. H., Grantham, J. J., Calvet, J. P. Localization of overexpressed c-myc mRNA in polycystic kidneys of the cpk mouse. *Kidney International* **41**, 317–325 (1992).
- 38.-** Trudel, M., D'Agati, V., Costantini, F. c-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney International* **39**, 665–671 (1991).
- 39.-** Lanoix, J., D'Agati, V., Szabolcs, M., Trudel, M. Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene* **13**, 1153–1160 (1996).
- 40.-** Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Molecular Genetics and Development, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada & Trudel, M. c-Myc Signalling in the Genetic Mechanism of Polycystic Kidney Disease. in *Polycystic Kidney Disease* (eds. Department of Internal Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Kidney Institute, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, USA & Li, X.) 231–258 (Codon Publications, 2015).
- 41.-** Sakamuro, D., Elliott, K. J., Wechsler-Reya, R., Prendergast, G. C. BIN1 is a novel MYC–interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nature Genetics* **14**, 69–77 (1996).
- 42.-** Elliott, K., Ge, K., Du, W., Prendergast, G. C. The c-Myc-interacting adaptor protein BIN1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene* **19**, 4669–4684 (2000).
- 43.-** Feng, J., Ge, S., Zhang, L., Che, H., Liang, C. Aortic dissection is associated with reduced polycystin-1 expression, an abnormality that leads to increased ERK phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Histochemistry* **60**, (2016).
- 44.-** Merrick, D., Bertuccio, C. A., Chapin, H. C., Lal, M., Chauvet, V., Caplan, M. J. Polycystin-1 cleavage and the regulation of transcriptional pathways. *Pediatric Nephrology* **29**, 505–511 (2014).
- 45.-** Talbot, J. J., Shillingford, J. M., Vasanth, S., Doerr, N., Mukherjee, S., Kinter, M. T., Watnick, T., Weimbs, T. Polycystin-1 regulates STAT activity by a dual mechanism. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* **108**, 7985–7990 (2011).

- 46.-** Hama, T., Park, F. Heterotrimeric G protein signaling in polycystic kidney disease. *Physiological Genomics* **48**, 429–445 (2016).
- 47.-** David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364–368 (2010).
- 48.-** Das, S., Anczukow, O., Akerman, M., Krainer, A. R. Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. *Cell Reports* **1**, 110–117 (2012).
- 49.-** Anczuków, O., Rosenberg, A. Z., Akerman, M., Das, S., Zhan, L., Karni, R., Muthuswamy, S. K., Krainer, A. R. The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**, 220–228 (2012).
- 50.-** Hopp, K., Ward, C. J., Hommerding, C. J., Nasr, S. H., Tuan, H. F., Gainullin, V. G., Rossetti, S., Torres, V. E., Harris, P. C. Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *Journal of Clinical Investigation* **122**, 4257–4273 (2012).
- 51.-** Fedeles, S. V., Gallagher, A. R., Somlo, S. Polycystin-1: a master regulator of intersecting cystic pathways. *Trends in Molecular Medicine* **20**, 251–260 (2014).