

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica Clínica



Mecanismos moleculares involucrados en la expresión del transportador de sodio/ioduro (NIS) en la membrana plasmática

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Licenciado Mariano Martín

Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CIBICI – CONICET)
Córdoba, Marzo de 2020

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan Pablo Nicola. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI – CONICET)

COMISIÓN ASESORA:

Dra. Ana María Masini-Repiso. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI – CONICET)

Dr. Ismael Bianco. Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba. (CEPROCOR)

Dr. Aldo A. Vilcaes. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIQUIBIC – CONICET).

EVALUADOR EXTERNO:

Dr. Javier G. Magadán. Instituto de histología y embriología de mendoza Dr. Mario H. Burgos. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET) en dependencias del Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC). El mismo fue llevado a cabo durante el desempeño de una Beca Doctoral otorgada por el CONICET. Los subsidios que financiaron este trabajo fueron otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica, la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba, el Instituto Nacional del Cáncer, la Asociación de Sobrevivientes de Cáncer de Tiroides, la Sociedad Latinoamericana de Tiroides y la Secretaría de Políticas Universitarias. Las pasantías de investigación fueron financiadas por la Compañía de Biólogos (The Company of Biologists), la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, y la escuela de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

*“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:
también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas”*

Marie Curie

A mi familia...

Resumen

La acumulación de yoduro constituye el primer paso en la síntesis de hormonas tiroideas. El transportador de sodio/yoduro (NIS) es una glicoproteína que se localiza en la membrana basolateral de la célula folicular tiroidea y media el transporte activo de yoduro. Defectos genéticos que conducen a la pérdida de función de NIS conllevan al desarrollo de hipotiroidismo congénito dishormonogénico producto de una deficiencia en el transporte de yoduro (ITD).

En adición a su rol en la biosíntesis hormonal, NIS constituye la piedra angular en el diagnóstico y tratamiento del carcinoma diferenciado de tiroides mediante la utilización de yoduro radioactivo. Desafortunadamente, 10-20% de los tumores tiroideos diferenciados y ~30% de las metástasis provenientes de tumores primarios capaces de acumular yoduro, pierden esta habilidad, siendo resistentes a la terapia con yoduro radiactivo. Particularmente, 70-80 % de los tumores tiroideos diferenciados expresan NIS en niveles normales (o aumentados) en comparación con el tejido normal adyacente. Sin embargo, NIS se localiza principalmente a nivel citoplasmático indicando que la disminución en la acumulación de yoduro se correlaciona con una alteración en su transporte a la membrana plasmática. A pesar de la relevancia clínica, aún se desconocen los mecanismos moleculares que determinan la expresión de NIS en la superficie celular. Considerando la importancia de conocer los mecanismos que regulan la expresión de NIS en la membrana plasmática, el objetivo del presente trabajo consiste en estudiar el rol de la región carboxilo terminal de la proteína y el efecto de variantes de NIS, identificadas en pacientes con hipotiroidismo congénito sospechados de ITD, en la expresión de NIS en la membrana plasmática.

En este trabajo demostramos la relevancia de la región carboxilo terminal en el transporte de NIS a la membrana plasmática. En esta región identificamos tres motivos aminoacídicos claves (motivo triptofano ácido, motivo monoleucina y motivo PDZ tipo 1) que al ser reconocidos por proteínas adaptadoras regulan la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral. El motivo triptofano ácido (563-LWWD-566) es reconocido por la proteína Cadena Liviana 2 de la Kinesina-1 (KLC2) que media la salida de NIS desde el retículo endoplásmico (RE) hacia el complejo de Golgi. El motivo monoleucina (577-EEVAIL-583) es necesario para el transporte basolateral de NIS desde el trans-Golgi (TGN) hacia la membrana plasmática basolateral, y sería reconocido por el complejo adaptador de clatrina 1B (AP1B). Por último, el motivo PDZ tipo 1 (641-TNL-643) es reconocido por la proteína polar SCRIB que estabiliza la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral, retardando su internalización y posterior degradación por vía lisosomal.

Por otra parte identificamos cinco nuevas variantes de NIS en pacientes con hipotiroidismo congénito y sospechados de ITD: D331N, G543R, S547R, G561E y L562M. Todas estas mutantes presentan maduración parcial a lo largo de la vía exocítica, revelando defectos en su expresión en la membrana plasmática y por ende, disminuyendo su capacidad de transportar yoduro, lo cual explica el fenotipo de los pacientes. De particular interés, las mutantes G561E y L562M, alteran el reconocimiento del motivo triptofano ácido por KLC2 produciendo la retención de las mutantes de NIS en el RE, disminuyendo consecuentemente su expresión en la membrana plasmática y por lo tanto la acumulación de yoduro en la célula folicular tiroidea.

Considerando la importancia de dilucidar los mecanismos que regulan la expresión de NIS en la membrana plasmática de la célula folicular tiroidea en relación a los defectos observados en el carcinoma diferenciado de

tiroides que limitan la eficacia terapéutica del tratamiento con yoduro radiactivo, nuestros estudios constituyen un avance significativo en la comprensión de los mecanismos que regulan la expresión de NIS en la membrana plasmática bajo condiciones fisiológicas. Estos hallazgos contribuirán a dar las bases para estudios futuros en células tumorales tiroideas que pondrán en evidencia los mecanismos que operan en el impedimento de la expresión de NIS en la membrana plasmática y permitirían desarrollar nuevas alternativas terapéuticas.

Abstract

The ability of thyroid follicular cells to concentrate iodide (I^-), an essential constituent of the iodine-containing thyroid hormones, relies on functional expression of the Na^+/I^- symporter (NIS) at the basolateral plasma membrane. Underscoring the significance of NIS for thyroid physiology, naturally occurring loss-of-function variants of the *slc5a5* gene—which encodes NIS—cause dyshormonogenic congenital hypothyroidism due to impaired I^- accumulation (ITD) in thyroid follicular cells. Also, the ability of thyroid cells to accumulate I^- constitutes the molecular basis for diagnosis and treatment of differentiated thyroid cancer. However, differentiated thyroid tumors often exhibit reduced (or even undetectable) I^- transport compared to normal thyroid tissue. Immunohistochemical analysis showed that most cold thyroid nodules express NIS at normal (or even increased) levels compared to adjacent normal tissue, but NIS is mainly located in intracellular compartments, indicating that it is not properly targeted to the plasma membrane. Therefore, considering that radioiodide therapy efficiency is ultimately dependent on functional NIS plasma membrane expression in tumor cells, understanding the mechanisms that regulate NIS targeting to the cell surface has important implications for radioiodide therapy. The aim of this work is to study the relevance of NIS carboxy terminus region and the effect of ITD-causing NIS mutants, identified in patients with congenital hypothyroidism, in NIS transport to the plasma membrane.

In this work we showed the relevance of the carboxy terminus in NIS intracellular transport. We identified three short linear motifs (SLiMs) involved in NIS expression at the plasma membrane: a tryptophan acidic motif, a monoleucine motif and a PDZ type 1 motif. The tryptophan acidic motif (563-LWWD-566) is recognized by Kinesin Light Chain 2 (KLC2) that mediates NIS exit from the endoplasmic reticulum (ER). The monoleucine motif (577-EEVAIL-583) is key in NIS basolateral transport in a process mediated by the clathrin adaptor protein 1B (AP1B). Finally, the PDZ motif is recognized by the polar protein SCRIB that stabilizes NIS expression at the basolateral plasma membrane and delays NIS internalization and lysosomal degradation.

Moreover, we identified five new ITD-causing NIS mutants in three patients with congenital hypothyroidism: D331N, G543R, S547R, G561E y L562M. All of these mutants exhibit partial maturation, revealing intracellular trafficking defects that lead to a decrease in iodide transport, thus explaining the phenotype of the patients. Particularly, the NIS mutants G561E and L562M -adjacent to the aforementioned tryptophan acidic motif-disturb its recognition by KLC2, thus leading to NIS accumulation in the ER and reducing iodide transport.

Although the molecular mechanisms that determine NIS intracellular retention in thyroid cancer remain elusive, our studies constitute a significant advance in the understanding of NIS trafficking and its plasma membrane expression. These findings may open new avenues to identify new molecular targets to treat radioiodide-refractory thyroid tumors, particularly those showing intracellular NIS expression.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas.....	1
1.2 Acumulación de yoduro.....	2
1.3 Transporte de yoduro en tejidos extratiroideos.....	3
1.4 Regulación de la función tiroidea.....	5
1.5 Regulación de la expresión de NIS.....	6
1.6 Defectos en el transporte de yoduro como causa de hipotiroidismo congénito.....	7
1.7 Regulación del transporte de NIS a la membrana plasmática.....	9
1.8 Bases moleculares de la terapia con yoduro radioactivo en el carcinoma diferenciado de tiroides.....	10
1.9 Mecanismos de transporte a la membrana plasmática.....	13
1.9.1 Transporte en células polarizadas.....	13
1.9.2 Señales o motivos de transporte.....	15
1.9.3 Proteínas adaptadoras y motoras.....	16
1.9.4 Estabilización y retención en la membrana plasmática.....	19
1.9.5 Disfunción del transporte intracelular y patogenia.....	20
2. Hipótesis y objetivos.....	22
3. Materiales y métodos.....	24
3.1 Pacientes y secuenciación del gen <i>slc5a5</i>	24
3.2 Plásmidos.....	24
3.3 Cultivo celular.....	25
3.4 Ensayos de transfección y generación de líneas celulares estables.....	26
3.5 Captación de yoduro.....	27
3.6 Obtención de extractos proteicos totales.....	27
3.7 Western blot (WB).....	27
3.8 Citometría de flujo y Separación celular activada por fluorescencia.....	28
3.9 Inmunofluorescencia en líneas celulares.....	30
3.10 Ensayos de co-inmunoprecipitación mediante GFP-Trap.....	30
3.11 Ensayo de ligación por proximidad (PLA).....	31
3.12 Mutagenesis sitio-dirigida y deleciones.....	31
3.13 Amplificación y purificación de plásmidos.....	32
3.14 Generación de partículas lentivirales.....	33

3.15 Silenciamiento de la expresión génica mediante ARN de horquilla corta (shRNA).....	33
3.16 Generación de células MDCK-II deficientes en SCRIB mediante CRISPR/Cas9	34
3.17 Cría de peces cebra	34
3.18 Obtención de embriones	34
3.19 Microinyección y silenciamiento de <i>klc2</i> en embriones de pez cebra inyectados	35
3.20 Inmunofluorescencia en Pez Cebra	36
3.21 Extracción de ARN de Pez Cebra	36
3.22 Modelado molecular y análisis bioinformático.....	36
3.23 Gestión de residuos peligrosos	37
3.24 Análisis estadístico	37
4. Resultados.....	38
4.1 El carboxilo terminal es determinante para el transporte de NIS a la membrana plasmática	38
4.1.1 El carboxilo terminal de NIS posee información relevante para el transporte intracelular de la proteína y su localización final en la membrana plasmática.....	38
4.1.2 Las regiones comprendidas entre los residuos I546_E578 y E578_K618 son claves en el transporte de NIS a membrana plasmática	39
4.1.3 Identificación y evaluación de motivos lineales cortos en el carboxilo terminal de NIS	42
4.2 Identificación de nuevas mutaciones en el gen <i>slc5a5</i> asociadas al desarrollo de hipotiroidismo congénito .43	
4.2.1 Cuadro clínico y secuenciación del gen <i>slc5a5</i> en pacientes con hipotiroidismo congénito.....	44
4.2.2 Caracterización funcional de las mutantes de NIS identificadas	46
4.3 Relevancia del motivo triptofano ácido (563-LWWD-566) del carboxilo terminal en la salida de NIS del RE asistida por KLC2.....	50
4.3.1 La disrupción del motivo triptofano ácido genera la retención de NIS en el RE.....	51
4.3.2 El motivo triptofano ácido del carboxilo terminal de NIS es reconocido por la proteína KLC2.....	52
4.3.3 TSH regula la expresión de KLC2	53
4.3.4 Importancia de la proteína KLC2 en la biosíntesis de hormonas tiroideas en pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	55
4.3.5 Las mutaciones G561E y L562M alteran el reconocimiento del motivo triptofano ácido por KLC2	57
4.4 Relevancia del motivo monoleucina (578-EEVAIL-583) del carboxilo terminal en el transporte de NIS a la membrana basolateral de células polarizadas.....	60
4.4.1 El motivo monoleucina determina la expresión basolateral de NIS	61
4.4.2 La disrupción de otros motivos de aminoácidos identificados en el carboxilo terminal no altera el transporte basolateral de NIS.....	61
4.4.3 La proteína adaptadora de clatrina AP1B es requerida para el transporte basolateral de NIS.....	62
4.5 Relevancia del motivo PDZ tipo 1 (641-TNL-643) en el mantenimiento de NIS en la membrana basolateral .64	

4.5.1 La disrupción del motivo PDZ tipo 1 produce la re-localización de NIS en cuerpos vesiculares intracelulares	65
4.5.2 La remoción del motivo PDZ tipo 1 conduce a la re-localización de NIS hacia endosomas tardíos y lisosomas.....	67
4.5.3 Identificación de proteínas con dominio PDZ capaces de reconocer el motivo PDZ de NIS	68
4.5.4 SCRIB interacciona con el motivo PDZ tipo I regulando la localización de NIS en la membrana plasmática	71
4.5.5 En ausencia de SCRIB, NIS se localiza en compartimentos vesiculares	72
4.6 Estudio de la expresión de los genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte de NIS a la membrana plasmática en el carcinoma papilar de tiroides.....	74
4.7 Anexo I: Estudio de la presencia de motivos de aminoácidos similares a los de NIS en otras proteínas de la vía de biosíntesis de hormonas tiroideas	78
5. Discusión	80
6. Conclusiones	91
7. Bibliografía	93
8. Abreviaturas.....	113
9. Publicaciones	115
9.1 Publicaciones relacionadas al presente trabajo de tesis	115
9.2 Publicaciones como co-autor durante el transcurso de esta tesis	115
10. Agradecimientos	116

1. Introducción

1.1 Biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas

La glándula tiroides está compuesta por dos lóbulos localizados uno a cada lado de la tráquea y conectados entre sí por un istmo que cruza la tráquea anterior por debajo del cartílago cricoides. Las células epiteliales tiroideas se organizan en estructuras foliculares que constituyen las unidades funcionales involucradas en la biosíntesis, almacenamiento y secreción de las hormonas tiroideas. Cada folículo está constituido por una capa simple de células epiteliales cuya membrana basolateral está en contacto con el torrente sanguíneo. La membrana apical delimita una cavidad central o lumen que contiene un material homogéneo denominado coloide (Figura 1) (1).

Las células foliculares tiroideas constituyen un tejido epitelial polarizado. Esta característica es fundamental para la biosíntesis hormonal al condicionar la localización del sistema responsable de la captación de yoduro en la membrana basolateral de los folículos en contacto con los capilares sanguíneos, mientras que las proteínas involucradas en la síntesis hormonal se encuentran en la membrana apical en contacto con el coloide. Existe, por lo tanto, un flujo polarizado de yoduro desde la membrana basolateral hacia el lumen folicular.

La glándula tiroides sintetiza y secreta las hormonas 3,5,3',5' tetraiodotironina o tiroxina (T4), que contiene cuatro átomos de yodo, y 3,5,3' triiodotironina (T3), que contiene tres átomos de yodo. En pequeñas cantidades también se secretan los precursores monoiodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT), y el compuesto sin actividad biológica 3,3',5' triiodotironina o T3 reversa (rT3) (2,3).

La biosíntesis de hormonas tiroideas involucra tres etapas secuenciales. La primera comprende el transporte de yoduro desde la sangre hacia el interior de la célula folicular a través de su membrana basolateral. La siguiente etapa es la organificación del yoduro, en la cual el yoduro es incorporado a los residuos tirosina de la molécula de tiroglobulina (Tg) con formación de MIT y DIT. Posteriormente tiene lugar la producción de iodotironinas mediante la reacción de acoplamiento con formación de T4 y T3. Los procesos de organificación y acoplamiento ocurren en la región apical de la célula folicular, más específicamente en la interfase célula-coloide, en el transcurso de la fusión de las vesículas exocíticas conteniendo la Tg con la membrana apical (Figura 1) (3,4). Dada la temática de esta tesis, solo se desarrollará en detalle la primera etapa de la biosíntesis de hormonas tiroideas, es decir la captación y acumulación de yoduro.

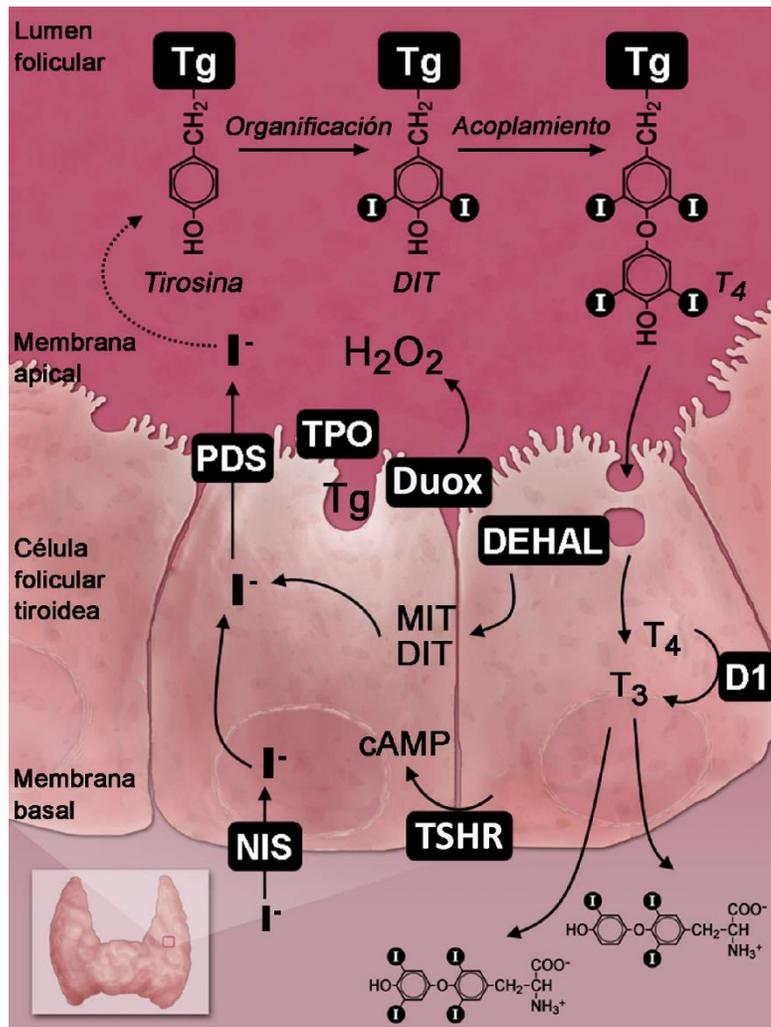


Figura 1. Representación esquemática de la biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Principales pasos involucrados en la biosíntesis de las hormonas tiroideas estimulados por la hormona estimulante de la tiroides (TSH) mediante unión a su receptor (TSHR). Acumulación activa de yoduro mediada por el transportador de yoduro (NIS) y eflujo del anión hacia el coloide posiblemente mediado por pendrina (PDS). Reacción de organificación efectuada por la peroxidasa tiroidea (TPO) en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por la oxidasa tiroidea dependiente de NADPH (Duox) en la cual el yoduro es incorporado a residuos tirosina en la molécula de tiroglobulina (Tg). Reacción de acoplamiento en la cual las iodotirosinas MIT y DIT dan lugar a la formación de las iotironinas T_4 y T_3 ancladas a la estructura de Tg. Endocitosis y degradación de Tg en fagolisosomas y liberación de las hormonas T_4 y T_3 . Deshalogenación de iodotirosinas MIT y DIT mediada por la deshalogenasa de iodotirosinas (DEHAL) y conversión de T_4 a T_3 mediante deshalogenación del anillo externo 5' catalizado por la deshalogenasa de iotironinas tipo 1 (D1).

1.2 Acumulación de yoduro

El yoduro es un elemento esencial e indispensable en la fisiología tiroidea dado que es un constituyente estructural de las hormonas tiroideas, únicos compuestos conocidos en vertebrados con actividad biológica que contienen yodo en su estructura. El suministro mínimo diario de yoduro en la dieta para una función

tiroidea normal ha sido estimado en 100-150 μg (5), aunque su ingesta presenta grandes variaciones de acuerdo al contenido del halógeno presente en el suelo y el agua del área donde se habita, así como entre individuos según las prácticas alimentarias (6). Una vez ingerido, el yoduro es rápidamente absorbido a nivel intestinal y distribuido en el plasma (7). La cantidad de yoduro plasmático se encuentra en equilibrio con el líquido extracelular y recibe tanto yoduro de la dieta como también una fracción que escapa de las células foliculares tiroideas y otra proveniente de la deshalogenación periférica de las hormonas tiroideas.

La captación de yoduro en la glándula tiroidea es un proceso altamente eficiente capaz de generar un gradiente hasta 40 veces mayor a su concentración plasmática (8). El transporte de yoduro al interior de la célula folicular tiroidea constituye el primer paso de la biosíntesis hormonal y es efectuado por el transportador de yoduro (NIS) ubicado en la membrana basolateral de la célula folicular tiroidea (9). En humanos, el gen que codifica el transportador, denominado *slc5a5*, se localiza en el cromosoma 19p12-13 con un marco de lectura de 1929 nucleótidos distribuidos a lo largo de 15 exones (10). NIS es una glicoproteína altamente hidrofóbica de 643 aminoácidos con 13 pasos transmembrana, alcanzando en su forma madura un peso molecular de 108 kDa (Figura 2) (11,12). La secuencia proteica de NIS humano presenta tres sitios de N-glicosilación en los residuos N225, N489 y N502, localizados en el tercer y el sexto bucle extracelular (Figura 2) (12). En la glándula tiroidea, el patrón electroforético de NIS se caracteriza por la presencia de un polipéptido parcialmente glicosilado (~60 kDa) y uno totalmente glicosilado (~90-100 kDa) (13). La forma parcialmente glicosilada de NIS corresponde a aquella proteína que aún no ha alcanzado la parte media del complejo de Golgi, mientras que la forma totalmente glicosilada corresponde a aquella proteína que se encuentra luego del Golgi medio, es decir trans-Golgi, vesículas secretorias y membrana plasmática. En células no polarizadas, las glicosilaciones parecen no ser críticas para la actividad o localización de NIS en la membrana plasmática (12,14).

El transporte de yoduro es un proceso activo dependiente del gradiente de sodio generado por la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, e involucra la translocación conjunta de dos cationes sodio y un anión yoduro hacia el interior celular (15). La gran capacidad de NIS para transportar yoduro reside en la habilidad de la proteína de unir dos iones sodio en un primer paso y de esta manera incrementar notablemente la afinidad por el yoduro (8). Sorprendentemente, a la concentración fisiológica de sodio, el 79% de las moléculas de NIS se encuentran ocupadas por dos iones sodio, lo cual incrementa la capacidad de NIS de unir y transportar yoduro (16). Aunque el principal rol fisiológico de NIS es transportar yoduro, se ha demostrado también que es capaz de mediar la acumulación activa de otros elementos como tecnecio, el cual es ampliamente usado en la clínica para realizar centellografía de tiroides (16,17). Otro sustrato de NIS con relevancia clínica es el contaminante ambiental perclorato (ClO_4^-) que inhibe competitivamente el transporte de yoduro y es utilizado en el test de descarga de perclorato para evaluar defectos en la organificación del yoduro (18). Además, la capacidad del tejido tiroideo de concentrar yoduro es utilizada con fines terapéuticos para el tratamiento del hipertiroidismo y de tumores tiroideos diferenciados mediante la administración de yoduro radiactivo (ver sección “Bases moleculares de la terapia con yoduro radioactivo en el carcinoma diferenciado de tiroides”) (19).

1.3 Transporte de yoduro en tejidos extratiroideos

Además de su expresión en la célula folicular tiroidea, NIS se expresa en diversos tejidos, en algunos casos diferenciándose en su patrón de glicosilación, como ocurre en estómago y glándula mamaria lactante, y su localización en la membrana plasmática basolateral o apical de acuerdo a los requerimientos de transporte de

ioduro del tejido. Todo tejido o epitelio que exprese NIS presenta la capacidad de transportar ioduro, como es el caso del epitelio ductal de glándulas salivales, la mucosa gástrica, el epitelio intestinal, la glándula mamaria lactante, la placenta, el riñón y el plexo coroideo (20). En particular, el fundamento de la prueba diagnóstica “relación de ioduro saliva/plasma” se basa en la capacidad de las glándulas salivales de concentrar ioduro en la saliva mediada por la acción de NIS.

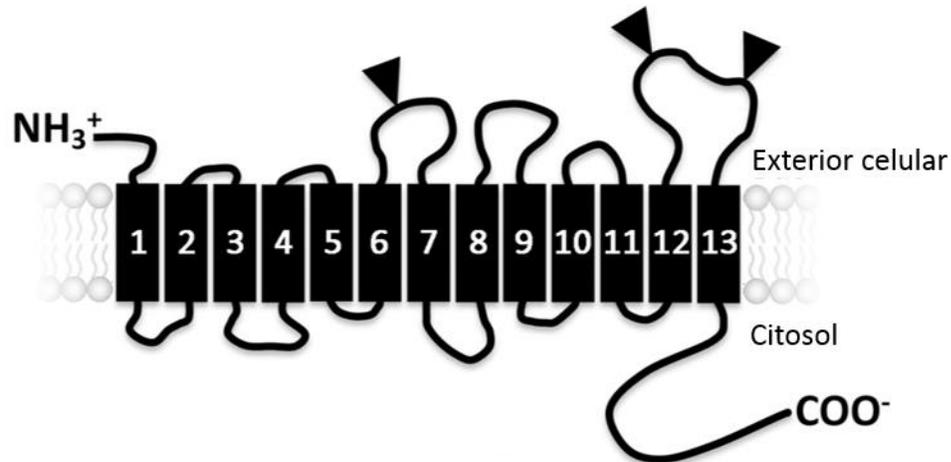


Figura 2. Esquema representativo de la estructura secundaria de la proteína NIS en humano. El modelo testeado experimentalmente posee 13 segmentos transmembrana y 3 sitios de N-glicosilación (representados con triángulos). El segmento amino terminal se localiza hacia la región extracelular, mientras que la región carboxilo terminal se ubica en el citoplasma celular.

Un aspecto diferencial que subyace la expresión de NIS en tiroides respecto a su expresión en tejidos extratiroides es la regulación por la hormona estimulante de tiroides (TSH), únicamente presente en tiroides. Esta regulación diferencial ha sido utilizada a nivel pre-clínico, pudiéndose suprimir la expresión del transportador en la glándula tiroides mediante la administración de hormona tiroidea, para protegerla durante la administración de compuestos radioterapéuticos en un eventual tratamiento de cáncer de mama y sus metástasis (21). Particularmente, la expresión de NIS en glándula mamaria responde al tratamiento con hormonas lactogénicas como oxitocina (22) generando una posible explicación de la presencia de NIS en la glándula mamaria lactante. Una forma de NIS diferencialmente glicosilada con respecto a aquella que se expresa en tiroides, es la que media el transporte activo del ioduro en el tejido mamario. Está presente en la membrana basolateral de las células epiteliales alveolares y en pequeñas células epiteliales ductales (22). La acumulación de ioduro en la glándula mamaria lactante permite enriquecer el contenido de ioduro en la leche materna y asegurar una adecuada provisión del oligoelemento al recién nacido. El contenido de ioduro en la leche es directamente proporcional a la ingesta de este elemento en la dieta materna (23). De hecho, se ha documentado la importancia de la suplementación de ioduro en dietas de madres lactantes presentando mutaciones en NIS causantes de deficiencia en el transporte de ioduro, en caso de que la dieta del niño se base exclusivamente en la ingesta de leche materna, para evitar posibles deficiencias de ioduro en el lactante (24).

Por otra parte, la expresión de NIS en placenta responde a la hormona gonadotrofina coriónica (GC), indicando que durante el embarazo dicha hormona actúa como regulador de la provisión de ioduro al feto (23,25). La

expresión de NIS en la membrana apical de trofoblastos placentarios revestiría de importancia en el aporte de yoduro al feto para la síntesis de sus propias hormonas tiroideas y la generación de reservas hormonales.

En cuanto a la función fisiológica del yoduro en el estómago y la glándula salival permanece aún sin ser dilucidada. Una de las posibles funcionalidades se centra en el “*ciclo gastro-intestinal del yoduro*” mediante el cual se evita la pérdida del oligoelemento y por otra parte con funciones relacionadas a su potente actividad antimicrobiana o antioxidante (25–27).

A nivel gastrointestinal, NIS se expresa en la membrana apical de enterocitos de las vellosidades del intestino delgado asociado a procesos de absorción. Estudios funcionales proponen que NIS sería el mediador fisiológico del proceso de absorción del yoduro como así también la principal proteína relacionada al metabolismo del halógeno en el organismo (7). El mismo yoduro sería regulador de la expresión de NIS en el intestino delgado mediante un mecanismo de control post-transcripcional (28).

1.4 Regulación de la función tiroidea

La disponibilidad de niveles suficientes de hormonas tiroideas es de vital importancia para el normal desarrollo y homeostasis metabólica del organismo. Particularmente, durante la infancia las hormonas tiroideas son claves para el correcto desarrollo del sistema nervioso central (29). Cuadros de hipotiroidismo en la niñez pueden conducir a desarrollo óseo retardado, estatura baja, retraso en el desarrollo psicomotor, discapacidades cognitivas e incluso, retrasos mentales severos irreversibles (30).

La regulación de una apropiada provisión de hormonas tiroideas depende de mecanismos sensibles y específicos. El almacenamiento hormonal en el coloide folicular y la gran versatilidad en la adecuación de la síntesis y secreción hormonal por la célula tiroidea contribuye a la estabilidad en el aporte hormonal (6). En el proceso de regulación participa un clásico mecanismo de retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo. Por otra parte, dentro de la propia célula folicular tiroidea operan mecanismos de autorregulación tendientes a mantener constante la producción hormonal (6).

La TSH es la hormona fundamental para la regulación morfológica y funcional de la glándula tiroidea (31). El eje hipotálamo-hipófisis, mediante la liberación de TSH, activa la síntesis y secreción de hormonas tiroideas ante una disminución de los niveles plasmáticos de estas hormonas. Por otra parte, un aumento en la concentración de hormonas tiroideas ejerce una retroalimentación negativa sobre el sistema hipotálamo-hipófisis. Anormalidades en los valores de TSH frecuentemente reflejan alteraciones en la función tiroidea (6).

La TSH es una hormona heterodimérica compuesta por una subunidad α común a la familia de hormonas glicoproteicas, que incluye las hormonas TSH, luteinizante (LH), foliculo estimulante (FSH) y CG, y una subunidad β específica, sintetizada únicamente en tirótrofos hipofisarios y determinante de su especificidad biológica. La glicosilación de TSH es requerida para su actividad hormonal y estabilidad en plasma. El proceso de glicosilación es dependiente de la acción de la hormona hipotalámica liberadora de TSH (TRH) y constituye un mecanismo de control sobre la generación de TSH bioactiva (32). En la regulación de TSH interviene un mecanismo de retroalimentación negativa por T_3 y T_4 . Estas hormonas ejercen una acción directa a nivel de tirótrofos reprimiendo la síntesis de la subunidad β principalmente y la secreción de TSH, disminuyendo

además el número de receptores de TRH. La secreción de TSH es inhibida por somatostatina, dopamina y glucocorticoides. También es influenciada por el sistema nervioso central y factores exógenos como procesos proinflamatorios (33).

El primer evento en la activación de la célula folicular tiroidea por TSH es su reconocimiento y unión a su receptor (TSHR), un receptor glicoproteico acoplado a proteínas G, presente en la membrana basolateral de la célula folicular tiroidea cuya porción extracelular es la responsable de la interacción con la TSH o con anticuerpos específicos con actividad estimulante o bloqueante presentes en enfermedades tiroideas autoinmunes, como la enfermedad de Graves (34,35). La interacción de TSH con TSHR desencadena una cascada de señales que finalmente lleva a la activación de genes de respuesta a TSH y que están involucrados, entre otros, en los procesos de biosíntesis de hormonas tiroideas (34).

La glándula tiroides no solo se encuentra regulada por TSH, sino que también el yoduro regula su crecimiento y función de forma directa e independiente de TSH. El bloqueo de la organificación en respuesta a cantidades elevadas de yoduro se denomina efecto Wolff-Chaikoff y es consecuencia de un aumento del yoduro intracelular (6,36). El efecto bloqueante del exceso de yoduro resulta en una disminución de la secreción hormonal, flujo sanguíneo y crecimiento tiroideo, independiente del efecto de TSH (20).

1.5 Regulación de la expresión de NIS

Desde hace más de 50 años se conoce que la captación de yoduro es un proceso dependiente de los niveles circulantes de TSH (3). Luego de la identificación de NIS como mediador de este proceso, ha sido confirmado que la función y la expresión del transportador en tiroides se encuentran bajo el estricto control transcripcional de TSH, mediado por el aumento intracelular de los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (37,38). La confirmación del efecto regulador de TSH sobre la expresión de NIS ha resultado del análisis del ratón hipotiroideo modificado genéticamente carente del receptor de TSH (TSHR^{-/-}). Este modelo fehacientemente demostró que la acción de TSH es indispensable para la expresión de NIS (39). Fue a partir de la caracterización de la región promotora del gen de NIS que se pudo dilucidar dicho mecanismo regulatorio. A diferencia de otros genes de expresión tiroidea, como Tg y TPO, NIS presenta regiones consenso características del elemento de respuesta a AMPc (CRE, del inglés *cAMP-response element*) en su región promotora. Esta diferencia entre genes de expresión específica en tiroides y NIS, ha permitido establecer una relación entre la expresión de NIS dependiente de TSH y de la regulación ejercida por factores de transcripción específicos de tiroides y aquellos que permiten la expresión de NIS en tejidos extratiroides (40).

Además se ha demostrado que TSH posee un efecto modulador sobre la distribución y la estabilidad proteica de NIS a nivel post-transcripcional, regulando su transporte hacia la membrana plasmática y degradación (41,42).

1.6 Defectos en el transporte de yoduro como causa de hipotiroidismo congénito

El hipotiroidismo congénito, definido como la deficiencia de hormona tiroidea desde el nacimiento, es el trastorno endocrino más común con una incidencia estimada de 1 cada 2000-3000 nacidos. En países con cantidades suficientes de yoduro en dieta, el 80-85% de los casos de hipotiroidismo congénito se debe a anomalías genéticas que resultan en disgenesias tiroideas (agenesia, hipoplasia, ectopia), y un 10-15% son consecuencia de defectos en genes que afectan alguno de los pasos involucrados en la biosíntesis de hormonas tiroideas (dishormonogénesis) (43). Un porcentaje menor de los casos se explica por la ausencia de estimulación de la glándula tiroidea debido a deficiencia de la hormona TSH (hipotiroidismo central) o defectos en la acción periférica, el transporte celular o el metabolismo de las hormonas tiroideas (44,45). Como se mencionó anteriormente, el hipotiroidismo congénito causa retraso en el crecimiento y retraso mental irreversible si no se trata con una adecuada terapia de reemplazo hormonal. Es por esto que los programas de pesquisa neonatal buscan detectar niveles elevados de TSH al nacimiento lo cual indica una producción deficiente de hormonas tiroideas. Si bien la mayoría de los pacientes con hipotiroidismo congénito se desarrollan de forma normal luego de la administración de levotiroxina, aquellos pacientes con defectos en el metabolismo de hormonas tiroideas no pueden ser tratados únicamente con esta hormona (46). Actualmente, el desarrollo de nuevos tratamientos para esta clase de pacientes es uno de los tópicos más desafiantes en el campo del hipotiroidismo congénito.

Dentro del hipotiroidismo congénito dishormonogénico, mutaciones en el gen *slc5a5*, causan una condición autosomal recesiva poco común, conocida como deficiencia en el transporte del yoduro (o ITD por sus siglas en inglés) debida a la incapacidad de la célula folicular tiroidea de acumular yoduro (10). Una condición de ITD se sospecha cuando el diagnóstico bioquímico de hipotiroidismo congénito se acompaña de una captación de yoduro severamente reducida o ausente en la glándula tiroidea y saliva, relación de yoduro saliva-plasma disminuida y niveles normales o elevados de tiroglobulina (47). Al momento de comenzar el presente trabajo de tesis doctoral se habían identificado dieciséis diferentes mutaciones en el gen *slc5a5* (-54C>T, V59E, G93R, R124H, Q267E, V270E, C272X, Y324LfsX12, Y348D, T354P, G395R, S509RfsX6, G543E, DelM143-Q323, DelV287-G288 y DelA439-P443) (Figura 3) en pacientes con ITD (10,48). A lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral, cuatro nuevas mutaciones han sido identificadas en el gen *slc5a5* (Y348D, N157Tfs159X, R636X, G250V) (Figura 3) en pacientes con ITD (48-50), acumulando un total de veinte mutaciones en el gen *slc5a5* asociadas a la patología al día de la fecha. Alteraciones en otros genes que podrían ser requeridos para la correcta expresión funcional de NIS en tirocitos no han sido reportados como causantes de ITD. Actualmente, la única proteína que ha sido reportada como facilitadora de la actividad de NIS en la tiroidea es el canal constitutivo de potasio KCNQ1-KCNE2. Ratones transgénicos que no expresan las subunidades KCNQ1 o KCNE2 desarrollan hipotiroidismo debido a deficiencias en el transporte de yoduro en la célula folicular tiroidea (51-53).

La evaluación detallada de pacientes con diferentes mutaciones en el gen *slc5a5* ha demostrado una substancial heterogeneidad clínica, bioquímica e imagenológica que parece correlacionar con cierta actividad residual de mutantes de NIS (54). El incremento en los niveles de TSH luego de la reducción en la síntesis de

hormonas tiroideas puede compensar parcialmente los defectos en la reducción de la captación de yoduro como consecuencia del aumento en la expresión de NIS, como se demostró en los pacientes que poseen la mutación T354P (55). En marcado contraste, pacientes que poseen mutaciones homocigotas que producen la falta total de actividad de NIS, desarrollan hipotiroidismo congénito desde neonatos (54). Además, la mencionada heterogeneidad ha sido reportada en pacientes que tienen la misma mutación en NIS (54). Los niveles de yoduro ingeridos mediante la dieta, influyen la función tiroidea en pacientes con ITD, en especial en aquellos en los cuales la mutación de NIS produce solo una pérdida parcial en la capacidad de acumular yoduro. Se destacan de esta manera, las marcadas diferencias que se evidencian entre hermanos alimentados en la infancia con leche materna proveniente de madre lactante con una dieta alta en yoduro o con leche regular artificial que contiene bajos niveles de yoduro (55). Altas concentraciones de yoduro en la dieta posibilitan la entrada de este ion a las células foliculares tiroideas, aun en ausencia de expresión funcional de NIS, mediante mecanismos alternativos con escasa afinidad por el halógeno y de esta manera facilitando la síntesis parcial de hormonas tiroideas (56). Vale destacar la importancia de la suplementación profiláctica de yoduro en recién nacidos cuyas madres lactantes poseen mutaciones en el gen *slc5a5*, para de esta manera prevenir el desarrollo de hipotiroidismo en el recién nacido producto de la deficiencia de yoduro en la leche materna (24).

La caracterización molecular detallada de diversas mutantes de NIS causantes de ITD ha provisto notables avances en la comprensión de los mecanismos que operan durante el ciclo de transporte y coordinación de iones (24,57,58), la identificación de residuos específicos o de regiones requeridas para el correcto plegamiento de la proteína (59,60), y regiones específicas importantes para el transporte de NIS a la membrana plasmática (pero no así para su actividad) y potencialmente involucradas en la interacción con proteínas adaptadoras requeridas en el proceso de transporte intracelular (59,61). La mutante R124H NIS no media acumulación de yoduro en células porque, aunque intrínsecamente activa, la proteína mutante es completamente retenida en el retículo endoplásmico. La substitución aminoacídica en la posición 124, localizada en el segundo bucle intracelular, revela un rol estructural clave para la posición δ del aminoácido R124 en la expresión de NIS en la membrana plasmática. De hecho, dicho amino- δ presenta interacciones moleculares con el grupo tiol de C440, localizado en el sexto bucle intracelular, lo cual es esencial para el correcto plegamiento requerido para la salida de NIS del retículo endoplásmico atravesando el sistema de control de calidad de dicha organela (59). Por otra parte, la mutante V270E NIS media una baja acumulación de yoduro debido a que el transporte de dicha proteína a la membrana plasmática se encuentra severamente afectado. Una carga negativa en el residuo en la posición 270, localizado en la región intracelular al final de la séptima región transmembrana, produce un marcado cambio electrostático en la superficie de esta región de carga positiva. Esto podría enmascarar un motivo de aminoácidos reconocido por proteínas adaptadoras que participan en el transporte de NIS a la membrana plasmática (61).

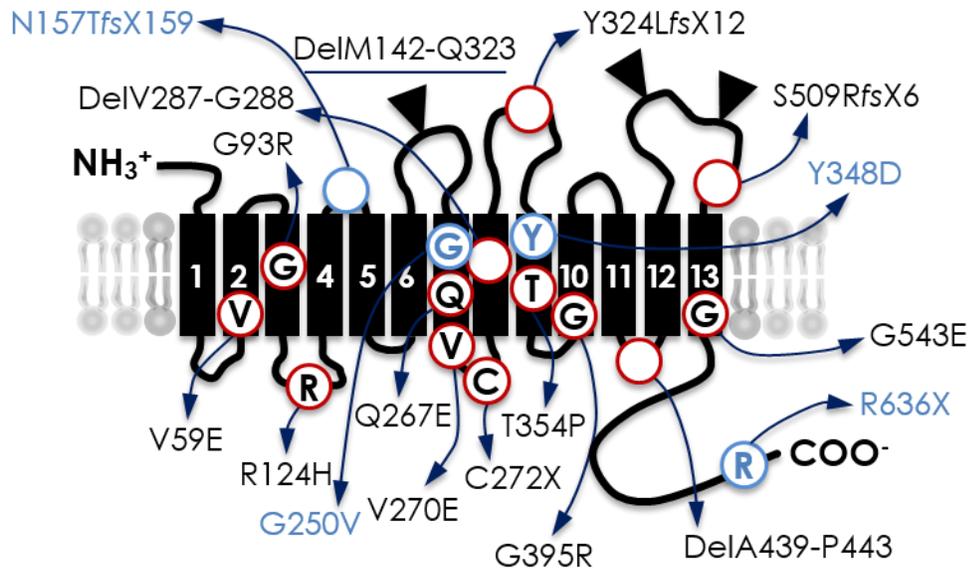


Figura 3. Esquema de las mutaciones causantes de deficiencia en el transporte de yodo (ITD). Las veinte mutaciones causantes de ITD se encuentran representados en el esquema de estructura secundaria de NIS. Se detalla el cambio a nivel proteico de cada mutación para cada posición en particular, utilizando el código de aminoácidos de una sola letra. Aquellas mutaciones reportadas hasta el año 2016 están marcadas por círculos rojos y letras negras, mientras que aquellas reportadas a lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral están marcadas por círculos y letras celestes.

1.7 Regulación del transporte de NIS a la membrana plasmática

La expresión de NIS en la membrana plasmática de la célula folicular tiroidea no es solo determinante para la acumulación de yodo necesario para la síntesis de hormonas tiroideas sino que también constituye la piedra angular para el tratamiento con yodo radioactivo del hipertiroidismo y tumores diferenciados de tiroides (62,63). A pesar de la importancia fisiológica y relevancia clínica de la expresión de NIS en la membrana plasmática, poco es sabido acerca del mecanismo molecular que subyace el transporte de NIS a la membrana plasmática, conocimiento que podría llevar a nuevas opciones terapéuticas que incrementen la efectividad de la terapia con yodo radiactivo.

Como se mencionó anteriormente, la TSH constituye el principal regulador de la expresión de NIS en la célula folicular tiroidea, no solo estimulando la expresión a nivel transcripcional sino también a nivel post-transcripcional incrementando su expresión en la membrana plasmática y la estabilidad de la proteína. Ante la privación de TSH, NIS se relocaliza hacia compartimentos intracelulares no caracterizados y modifica su patrón de fosforilación en residuos no caracterizados (41). Esta modificación post-traducciona ha sido propuesta como un posible mecanismo de control del transporte intracelular de NIS. Si bien se ha demostrado que fosforilaciones en las serinas 43 y 581 de NIS modulan la actividad del transportador, mientras que en la treonina 577 modularía la estabilidad, ninguna fosforilación ha sido vinculada al proceso de transporte intracelular de NIS (42).

Nuevas consideraciones en cuanto a determinantes estructurales que controlen el transporte de NIS a la membrana plasmática surgieron a partir del estudio y caracterización funcional de la mutante S509RfsX6 NIS

causante de ITD. Esta mutante carece del segmento transmembrana 13 y todo el extremo carboxilo terminal de la proteína. Curiosamente, la mutante es completamente retenida de forma intracelular, sugiriendo que el extremo carboxilo terminal podría contener información crucial para el correcto transporte de NIS a la membrana plasmática (64). El carboxilo terminal de NIS es una región de desorden intrínseco al no presentar estructuras secundarias estables, lo cual la constituye como una región blanco de modificaciones post-traduccionales así como también de interacción con proteínas adaptadoras que reconocen motivos lineales cortos de aminoácidos, o sorting motifs, y asisten en el transporte intracelular (ver sección “Señales de transporte”). Si bien han sido realizados estudios de algunos posibles motivos cortos de aminoácidos localizados a lo largo de NIS, ningún motivo relevante ha sido reportado en el carboxilo terminal (65). No obstante, se ha identificado un motivo PDZ no canónico en el segundo bucle intracelular, entre los residuos 118-121, el cual está involucrado en la correcta salida de NIS desde el retículo endoplásmico hacia el complejo de Golgi (65). Sin embargo, aún se desconoce si la disrupción de este motivo ocasionaría un problema en el plegado de la proteína o si este motivo es reconocido por alguna proteína involucrada en el tráfico intracelular del transportador.

Como se mencionó previamente, NIS puede localizarse en la membrana basolateral de células foliculares tiroidea, o bien, en la membrana apical del epitelio intestinal o del túbulo contorneado proximal. Sin embargo, los mecanismos que regulan su expresión en un subdominio en particular de la membrana plasmática permanecen desconocidos.

1.8 Bases moleculares de la terapia con yoduro radioactivo en el carcinoma diferenciado de tiroides

Por más de 75 años, la habilidad de la célula folicular tiroidea de acumular yoduro ha constituido la base molecular del diagnóstico y tratamiento del carcinoma diferenciado de tiroides (66). La terapia con yoduro radioactivo usada para eliminar metástasis provenientes de carcinomas tiroideos y sus remanentes luego de la tiroidectomía, constituye posiblemente el tratamiento más exitoso en oncología. Estudios retrospectivos han demostrado que la habilidad de las células tumorales de acumular yoduro es el mejor indicador de sobrevida libre de enfermedad (67–69). Actualmente, la terapia radioactiva, utilizando como adyuvante estimulador la TSH, es recomendada de rutina luego de la extirpación total de la glándula tiroidea en casos de carcinomas de tiroides de alto riesgo (70). Sin embargo, los tumores tiroideos diferenciados suelen poseer una baja, o incluso nula, captación de yoduro en comparación con el tejido tiroideo normal y de hecho, son diagnosticados como nódulos fríos mediante centellografía de la glándula. A pesar de esta reducción, más del 70% de los carcinomas diferenciados de tiroides son capaces de acumular cantidades significativas de yoduro que son suficientes para abordar un tratamiento con yoduro radioactivo (40). Desafortunadamente, alrededor del 30% de los tumores primarios diferenciados y el 50% de las metástasis provenientes de estos tipos de tumores pierden completamente la capacidad de acumular yoduro, convirtiéndose de esta manera en tumores refractarios al tratamiento con yoduro radioactivo (71). La pérdida de la capacidad de acumular yoduro está asociada con un mal pronóstico, ya que aquellos pacientes con metástasis capaces de acumular yoduro presentan una sobrevida a 10 años de aproximadamente el 56%, mientras que aquellos que presentan

metástasis refractarias al tratamiento con yoduro radioactivo presentan una supervivencia a 10 años inferior al 10% (68).

La eficacia del tratamiento con yoduro radioactivo depende directamente de la expresión funcional de NIS en la membrana plasmática de las células tumorales. Deficiencias en la acumulación de yoduro radioactivo son la mayor causa de fallas en el tratamiento (71). Según los estudios reportados en el atlas del genoma del carcinoma papilar de tiroides, la expresión de NIS se encuentra frecuentemente disminuida en carcinomas tiroideos en comparación con el tejido tiroideo normal adyacente (72). Además, la expresión de NIS se encuentra conservada respecto al tejido normal y aumentada respecto a tumores tipo BRAF-like en carcinomas de fenotipo tipo RAS (RAS-like) dado que este tipo de tumores presentan un mayor grado de diferenciación que aquellos tumores de fenotipo tipo BRAF (72). De hecho, la expresión de NIS se encuentra completamente silenciada en carcinomas de tiroides poco diferenciados e indiferenciados (anaplásicos) (73). Múltiples mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales han sido postulados para explicar la represión de la expresión de NIS en tumores tiroideos (74,75).

Sorprendentemente, diferentes análisis inmunohistoquímicos (usando distintos anticuerpos contra NIS humano) mostraron que NIS se expresa en distintos niveles en carcinomas diferenciados de tiroides en comparación con el tejido normal adyacente (76). Sin embargo, se reportó que NIS se encuentra en compartimentos intracelulares en el ~80% de los carcinomas de tiroides que lo expresan, lo cual sugiere anomalías en el proceso de transporte de NIS a la membrana plasmática (76–83). Esta localización intracelular de NIS ha sido propuesta como una de las razones de la disminución de acumulación de yoduro radioactivo en células tumorales. Significativamente, no han sido identificadas mutaciones en el gen que codifica para NIS en tumores tiroideos (84), por lo que la retención intracelular del transportador no podría ser atribuida a defectos estructurales como ocurre en el caso de algunas mutaciones encontradas en pacientes con ITD (14,59).

Estudios recientes proponen que la transformación oncogénica inducida por BRAF^{V600E} reprime la expresión de proteínas involucradas en el transporte de NIS a la membrana plasmática o, alternativamente, induce la expresión de proteínas que remueven a NIS de la superficie celular, produciéndose así su retención intracelular (85). Una de las proteínas reportadas como interactora de NIS y que podría estar involucrada en el tráfico deficiente del transportador a la membrana plasmática en cáncer de tiroides es el factor de interacción con el gen transformante tumoral pituitario (PBF) (86,87). PBF interactuaría con NIS produciendo su internalización en endosomas tardíos, positivos para el marcador CD63, a través de la vía endocítica mediada por clatrina, y por lo tanto disminuyendo el transporte de yoduro. Esta interacción se encuentra regulada por la fosforilación de la tirosina 174 de PBF modulada por la tirosina quinasa Src. De hecho, la inhibición de la actividad quinasa de Src, y por ende de la fosforilación de PBF necesaria para la interacción e internalización de NIS, restablece la expresión de NIS en membrana plasmática y por ende la acumulación de yoduro (88).

También se ha reportado un posible vínculo entre la disminución en la expresión de la subunidad clase U de anclamiento y biosíntesis de fosfatidilinositol glicano (PIGU) de la transamidasa GPI, que cataliza la adhesión de glicosilfosfatidilinositol (GPI) a proteínas en el retículo endoplásmico y la expresión de NIS en la membrana plasmática en carcinomas de tiroides. La sobreexpresión de dicha subunidad en un modelo de carcinoma de tiroides restableció la expresión de NIS en la superficie celular, hecho llamativo ya que NIS carece de sitios

consensos para modificaciones post-traduccionales por GPI. Sin embargo, defectos en la transamidasa GPI no actuarían directamente sobre NIS sino sobre otra proteína, aún no identificada y necesaria para la expresión del transportador en la membrana plasmática (89).

Recientemente, se identificaron dos nuevas proteínas interactoras de NIS que regulan su expresión en membrana plasmática en modelos de carcinomas tiroideos: la proteína factor de ribosilación 4 (ARF4) y la proteína que contiene valosina (VCP). Los autores identificaron a ARF4 como una proteína que regularía el transporte de NIS desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, mientras que VCP interaccionaría con NIS a nivel reticular mediando su degradación por la vía proteosomal. Es particularmente interesante destacar que existen diversas drogas capaces de inhibir la acción de VCP. La inhibición de VCP en cultivos primarios de tirocitos de ratón produjo un incremento de la captación de yoduro mediada por NIS, resultado que abre las puertas a posibles tratamientos que aumenten la captación de yoduro en el carcinoma diferenciado de tiroides (90).

Por otra parte, la comprensión de los mecanismos moleculares que reprimen la expresión funcional de NIS habilitó el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos que permitirían disminuir la dosis requerida de yoduro radioactivo como también aplicar esta en tumores refractarios al tratamiento radioactivo. La activación oncogénica de la vía de las MAPK conlleva a una dediferenciación celular con pérdida de la expresión de genes requeridos para la biosíntesis de hormonas tiroideas, entre ellos NIS. De esta manera el programa genético que permite la acumulación de yoduro se encuentra reprimido por la activación oncogénica (91). El desarrollo de nuevas terapias de recuperación de la expresión funcional de NIS por medio de la inhibición de las vías de señalización de las MAPK ha permitido mejorar la capacidad de acumular yoduro radioactivo de metástasis de carcinomas tiroideos refractarios a dicho tratamiento (92,93). La inhibición de forma específica de la vía de las MAPK con agentes inhibidores como dabrafenib o selumetinib apunta a la rediferenciación del tumor evitando así el suministro continuo de los agentes inhibidores a lo largo del tratamiento y por ende disminuyendo los efectos secundarios. Si bien el tratamiento con un solo agente demostró pobre respuesta en largos períodos de tiempo, la terapia combinada con el inhibidor de BRAF^{V600E}, dabrafenib y el inhibidor de MEK1/2, selumetinib, permite subsanar la resistencia desarrollada por ciertos tumores y abordar nuevamente el tratamiento con yoduro radioactivo. Además, la identificación de nuevas moléculas pequeñas inhibidoras de la vía de las MAPK con diferentes mecanismos de acción, como el inhibidor alostérico de MEK conocido como CKI, o el inhibidor de BRAF^{V600E} vemurafenib, han demostrado una alta y sostenida inhibición de la señalización MAPK/ERK, constituyéndose en posibles nuevas estrategias para aumentar la capacidad de acumular yoduro radioactivo en tumores refractarios a dicho tratamiento (94,95).

La eficacia del tratamiento con yoduro radiactivo se relaciona directamente con la dosis de radiación terapéutica entregada a la célula tumoral y su sensibilidad a la radiación. El principal determinante en la dosis de radiación terapéutica tomada por la célula tumoral consiste en la acumulación de yoduro producto de la expresión de NIS en su membrana plasmática (71). Por consiguiente, la eficacia del tratamiento no sólo depende de la expresión de NIS sino de su adecuada localización en la membrana plasmática y cualquier estrategia terapéutica dirigida a recuperar la expresión de NIS en el tumor debe considerar este hecho. La comprensión de los factores que desencadenan la represión de la actividad de NIS mediante su remoción de la membrana plasmática sería de extrema importancia para mejorar la eficacia del tratamiento en aquellos

tumores que no logran la acumulación de una dosis efectiva del radioisótopo durante el tratamiento debido a una localización del transportador predominantemente intracelular. Se debe considerar que si un mayor número de moléculas de NIS se insertaran apropiadamente en la membrana celular de la célula tumoral, la eficacia del tratamiento se incrementaría dramáticamente y permitiría disminuir la dosis del radioisótopo reduciendo al mínimo los efectos secundarios del tratamiento (66). En relación a este último punto, la demostración de la expresión endógena de NIS en ~80% de tumores de mama sugirió la aplicabilidad de esquemas de radioterapia con yoduro radiactivo para su tratamiento (96). Desafortunadamente, investigaciones subsiguientes demostraron que metástasis de tumores mamarios que expresan NIS no acumulan la dosis de yoduro radiactivo necesaria para que sea efectiva, en parte debido a un alto porcentaje de expresión intracelular de NIS ya que solo el 24% de los tumores mostraron expresión en la membrana plasmática (21). El conocimiento exhaustivo de las bases moleculares que determinan el transporte de NIS a la membrana plasmática tendría implicancias directas en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas aplicables a la mejora del tratamiento con yoduro radiactivo, diseñadas racionalmente sobre bases experimentales sólidas. Estos hallazgos permitirán el establecimiento de posibles blancos terapéuticos para recuperar la acumulación de yoduro en tumores refractarios a la terapia que expresan NIS, o que funcionen como adyuvantes en terapias que inhiban la actividad oncogénica y recuperen la diferenciación del tejido tiroideo.

1.9 Mecanismos de transporte a la membrana plasmática

1.9.1 Transporte en células polarizadas

Numerosos epitelios polarizados se extienden a lo largo del cuerpo humano recubriendo las superficies y cavidades de órganos. Su principal función es la protección y el mantenimiento de estructuras y de la homeostasis del organismo regulando el intercambio de diversas sustancias entre el interior y el exterior de cada tejido. El transporte vectorial de moléculas e iones es llevado a cabo por diversos transportadores y canales que se expresan diferencialmente en distintos dominios de la membrana plasmática polarizada. También los receptores de membrana presentan una expresión diferencial en membrana plasmática acorde a la molécula blanco que sensen (97). En particular, la membrana plasmática de un epitelio polarizado se divide en un dominio apical y uno basolateral divididos por las uniones estrechas (98,99). Esta asimetría en la superficie celular polarizada se logra mediante mecanismos complejos de transporte diferencial de proteínas y lípidos que constituyen cada uno de los dominios de la membrana plasmática.

Como en cualquier sistema celular, la síntesis de proteínas de membrana o de secreción que van a ser transportadas a lo largo de la vía secretoria de forma anterógrada comienza en el retículo endoplasmático (RE) (Figura 4). Es en este compartimento membranoso donde se produce el correcto plegamiento de la proteína, asistido por chaperonas, y las primeras modificaciones post-traduccionales (N-glicosilación). Posteriormente, aquellas proteínas que superan los sistemas de sensado de correcto plegamiento son reclutadas a regiones especializadas del RE, denominadas sitios de salida del RE (ERES - "ER Exit Sites") y luego almacenadas en vesículas que forman un compartimento intermedio entre RE y Golgi conocido como ERGIC, por sus siglas en inglés. Estas vesículas podrán volver al RE por medio de la vía retrógrada de transporte o continuar por la vía anterógrada fusionándose con la región Cis del complejo de Golgi (CGN) (Figura 4). En esta organela las

proteínas sufren nuevas modificaciones post-traduccionales, principalmente O-glicosilaciones y modificaciones de las N-glicosilaciones ocurridas en el RE, para luego ser transportadas en vesículas hacia el compartimento donde cumplirá con su función biológica (100). En epitelios polarizados, el sistema de endomembranas por el cual salen las vesículas de transporte, conocido como trans-Golgi network (TGN), fue considerado por mucho tiempo como el lugar donde se determina el destino final de los lípidos y proteínas de membrana (101). Sin embargo, muchos estudios han demostrado que el proceso de transporte diferencial no está confinado exclusivamente al TGN (102–106). Si bien muchas proteínas cargo pueden viajar desde el TGN hacia sus membranas de residencia final por medio de vesículas secretorias, algunas proteínas pueden avanzar desde el TGN hacia compartimentos endosomales para luego alcanzar su destino final en la célula. Algunas proteínas de localización basolateral atraviesan endosomas comunes de reciclado (CRE) para llegar a la membrana basolateral, mientras que otras pueden hacerlo por medio de endosomas de sorting o selección basolateral (BSE) (107). Por otra parte, las proteínas de expresión apical atraviesan endosomas apicales de reciclado (ARE), también conocidos como endosomas de selección apical (ASE), para alcanzar su localización final en la membrana apical (107,108). Las proteínas con dominios transmembrana internalizadas o endocitadas que entran a estos compartimentos de reciclado pueden ser recicladas a la membrana plasmática, degradadas en lisosomas, entrar en la vía de transcitosis o volver a TGN por transporte retrógrado (104) (Figura 4).

La liberación de los cargos de las vesículas provenientes de TGN o endosomas debe estar coordinada con el transporte de dichas vesículas y la interacción de las mismas con la membrana blanco. Tanto los microtúbulos como los microfilamentos cumplen importantes roles en estos procesos (109). El transporte de vesículas a lo largo de microtúbulos es llevado adelante por proteínas motoras principalmente de las familias de las kinesinas (110–112) (ver sección “Proteínas adaptadoras y motoras”), aunque también se ha reportado la relevancia de dineínas en estos procesos (113). Por otra parte, los filamentos de actina no solo proporcionan estructura y forma a la célula, sino que también intervienen en los procesos de transporte vesicular (109,114–116). Las proteínas miosinas han sido incluso vinculadas en los procesos de transporte intracelular (117,118).

Los fenómenos de formación vesicular (119,120), transporte a lo largo del citoesqueleto (121,122) y reconocimiento y fusión con membranas blanco (123–125) están regulados por proteínas Rab GTPasas (del inglés “Ras-related monomeric GTPase superfamily”) tanto en la vía endocítica como secretoria. Existen 66 genes que codifican para diferentes proteínas Rab (126), las cuales se localizan en la superficie citoplasmática de compartimentos o vesículas membranosas regulando los distintos pasos de los procesos de transporte intracelular (127).

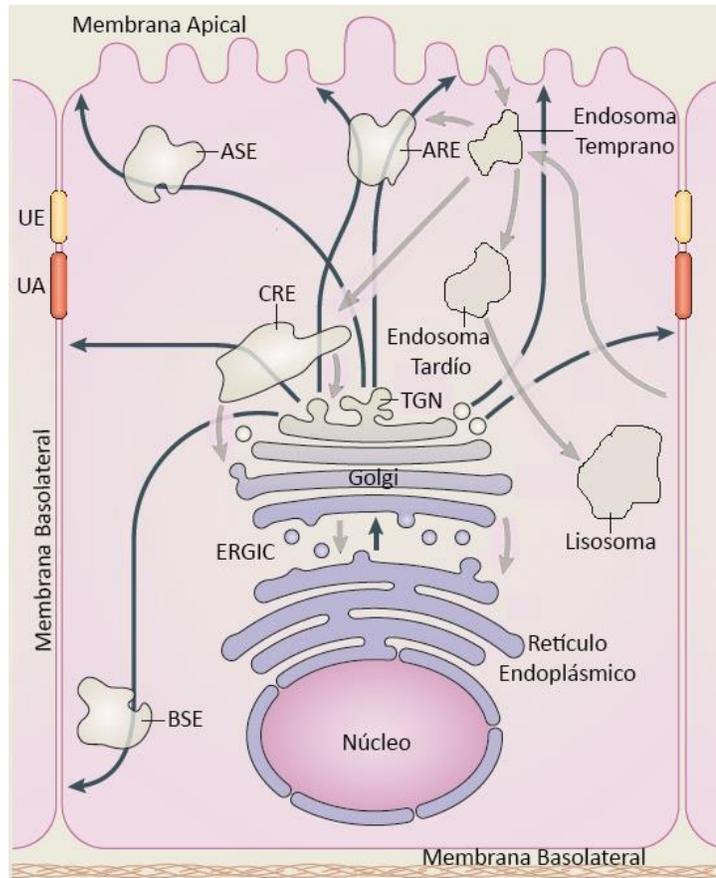


Figura 4. Esquema de las vías de transporte intracelular de proteínas en células polarizadas. Las vías de transporte intracelular se encuentran representadas, detallándose cada una de las organelas involucradas. La vía anterógrada de transporte hacia membrana plasmática se encuentra representada por flechas sólidas negras, mientras que la vía de transporte retrógrado y endocitosis por flechas sólidas grises. UE: Uniones Estrechas. UA: uniones adherentes. ERGIC: Compartimento intermedio Retículo Endoplásmico-Golgi. TGN: Red Trans-Golgi. CRE: Endosomas Comunes de Reciclado. ARE: Endosomas Apicales de Reciclado. ASE: Endosomas Apicales de Sorting. BSE: Endosomas Basolaterales de Sorting. Modificado de Rodriguez-Boulan *et al.* 2014. Nature Cell Biology.

1.9.2 Señales o motivos de transporte

Los mecanismos de transporte diferencial a los compartimentos de membrana plasmática son múltiples y complejos. Los primeros acercamientos a la comprensión molecular de estos mecanismos comenzaron con la identificación de señales de transporte, o señales de sorting, apical y basolateral (128,129). Las señales de transporte son en primera instancia motivos lineales cortos de aminoácidos (SLiMs, por sus siglas en inglés) codificados en la estructura primaria de la proteína, y que pueden dar lugar a modificaciones post-traduccionales o a interacciones con dominios globulares de proteínas (130). Estas señales son de suma importancia en cada uno de los pasos del proceso de transporte intracelular (131–133) y determinan el destino final de la proteína en la célula. Vale aclarar que la interpretación de cada una de las señales de transporte depende del contexto y la funcionalidad de cada célula.

Los procesos de transporte apical están determinados por tipos particulares de señales de transporte en dominios extracelulares, transmembrana o citoplasmáticos de la proteína cargo. Dentro de las señales de sorting apical se encuentran la adhesión de GPI (134,135), N y O glicosilaciones (109,136,137), y secuencias transmembrana específicas (138,139). En todos los casos, el transporte apical estaría mediado por la formación de los denominados grupos de balsas lipídicas (lipid rafts clusters), favorecidos por lectinas lumenales que interactúan con residuos manosas de glicosilaciones (140,141) o por la acción de otras proteínas que interactúan con colesterol como la Caveolina-1 (142). Sin embargo, los mecanismos moleculares que median el transporte apical de proteínas aún no son bien conocidos.

Por otra parte, las señales de transporte basolateral están mejor definidas en comparación con las señales de transporte apical. Se trata de secuencias cortas de aminoácidos que se encuentran en las regiones citoplasmáticas de proteínas transmembrana, usualmente definidas como regiones de desorden intrínseco, es decir que no poseen una estructura secundaria definida (143). Esto es importante dado que para que estos motivos cortos de aminoácidos o motivos de transporte sean reconocidos por proteínas adaptadoras, o involucradas en los procesos de transporte intracelular, deben encontrarse de forma lineal desestructurada. Otra característica importante de estos motivos es que son transplantables, es decir que al colocarlos en otra proteína distinta pueden determinar la localización final de la misma como lo hacen en la proteína donde fueron identificados (143). Estos motivos de transporte incluyen motivos basados en tirosinas (YxxØ), motivos NPxY, motivos basados en leucinas ([D/E]xxxL[L/I]) o di-hidrofóbicos en vecindad con regiones ácidas (nomenclatura de aminoácidos de una sola letra, donde x puede ser cualquier aminoácido y Ø es un aminoácido de hidrofobicidad alta) (108,144–146). Además existen otros motivos de transporte basolateral no clásicos como motivos monoleucina (147) o grupos de aminoácidos cargados (148), como también motivos específicos que han sido asociados al transporte basolateral (149–154). La disrupción de dichos motivos por técnicas de mutagénesis sitio dirigida o su bloqueo por péptidos, puede conllevar a la acumulación de la proteína cargo en compartimentos membranosos como RE, TGN o endosomas (131–133,155). También el bloqueo de motivos de transporte basolateral posee un efecto en células no polarizadas, produciéndose la retención de las proteínas cargo en TGN (132).

Las señales de transporte poseen un orden jerárquico que se hace presente al interrumpir o bloquear la señal primaria. La disrupción de motivos de transporte basolateral conlleva muchas veces a la relocalización de la proteína hacia la membrana apical, denotando la presencia de señales de localización apical enmascaradas por señales basolaterales (156). Los mecanismos que determinan la jerarquía de las señales de transporte en una misma proteína aún no han sido comprendidos en su totalidad.

1.9.3 Proteínas adaptadoras y motoras

Los motivos de aminoácidos asociados a transporte intracelular son reconocidos por proteínas que asisten estos procesos. Puede tratarse de proteínas adaptadoras, que vinculen a la proteína cargo con proteínas motoras que la transporten intracelularmente hacia su destino final en la célula, o directamente proteínas motoras capaces de reconocer motivos de aminoácidos en las proteínas cargo. También en algunos casos los motivos de aminoácidos interactúan con proteínas de andamiaje que permiten la formación de complejos proteicos que estimulan o inhiben determinadas vías o actividades celulares.

Un dato notorio que trajo aparejado el descubrimiento de las señales de transporte basolateral fue su alta similitud con señales endocíticas (143,157). De hecho señales similares intervienen tanto en rutas endocíticas como de transporte basolateral (129,150). Este tipo de señales son conocidas como compañeros de interacción de proteínas adaptadoras (APs) específicas de organela (146). Las APs son proteínas heterotetraméricas que constituyen una familia de cinco miembros. (146,158,159). Estos heterotetrámeros están formados por dos subunidades grandes denominadas γ y $\beta 1$ en el caso de AP1 y α y $\beta 2$ en el caso de AP2, una subunidad mediana o subunidad μ y una subunidad pequeña o subunidad σ .

Desde hace tiempo se conoce que la clatrina es una proteína involucrada en los procesos de formación de vesículas endocíticas en la membrana plasmática (160). Sin embargo, hace poco más de diez años se vinculó a la clatrina con procesos de transporte intracelular y en particular con procesos de transporte basolateral (161). Las APs, a excepción de AP4, son proteínas que interactúan de forma directa con clatrina, por medio de las subunidades β (162,163) y/o γ/α (164,165), actuando en conjunto en el transporte vesicular (161,166). Además, regiones particulares de las subunidades β y γ/α , denominadas “orejas”, reclutan otras proteínas a membrana que participan en los procesos de transporte, fusión y liberación de cargo vesicular (159,167,168).

Las APs reconocen tanto motivos basados en tirosina como motivos di-leucina involucrados en procesos de endocitosis o transporte basolateral. El reconocimiento de los motivos basados en tirosina está dado por la subunidad μ de las proteínas adaptadoras (169,170), mientras que los motivos di-leucina son reconocidos por un bolsillo con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas que se genera en la interfaz de las subunidades γ y $\sigma 1$, en el caso de AP1, y α y $\sigma 2$, en el caso de AP2 (171). Además cada una de estas subunidades presenta múltiples isoformas codificadas por distintos genes. Muchas de estas subunidades pueden ensamblarse de manera diferencial y complementaria ampliando el repertorio de isoformas de APs y por ende, la regulación del transporte intracelular (171).

La AP2 reconoce motivos basados en tirosina y motivos di-leucina en procesos de endocitosis y es, posiblemente, la proteína adaptadora más estudiada. En contraste, la AP1 está involucrada en los procesos de transporte intracelular y hacia la membrana plasmática. AP1 presenta dos isoformas que solo difieren en una de las subunidades. La subunidad $\mu 1A$ es de expresión ubicua y da lugar a la isoforma AP1A, mientras que la subunidad $\mu 1B$ solo presenta expresión epitelio específica y da lugar a la isoforma AP1B (172,173). Otra diferencia entre estas isoformas es su localización sub-celular. Mientras que la subunidad $\mu 1B$ reside en compartimentos endosomales posteriores al TGN, la subunidad $\mu 1A$ se localiza en TGN (174–176). Esta diferencia en la asociación de las proteínas adaptadoras con organelas específicas se debería a la diferente capacidad de asociación de las distintas subunidades μ con fosfolípidos de membrana (173). Si bien los complejos AP1A y AP1B poseen claras diferencias, presentan la capacidad de complementar sus funciones, pudiendo una isoforma reemplazar a la otra en determinadas circunstancias. Durante mucho tiempo se vinculó a los complejos AP1, en particular AP1B, exclusivamente en procesos de transporte a la membrana plasmática basolateral de células epiteliales. Sin embargo, un reciente estudio demuestra la relevancia de los complejos AP1, en especial AP1A, tanto en los procesos de transporte basolateral como también apical (177).

Otras proteínas adaptadoras miembros de la familia han sido menos estudiadas que AP2 y AP1. Sin embargo, AP4 ha sido vinculada también en el transporte basolateral y endosomal (178,179), mientras que AP3 y AP5 han sido vinculadas al transporte endosomal (179,180). Existen también otras clases de proteínas adaptadoras

capaces de reconocer motivos di-leucina e interactuar con clatrina. Las GGAs (del inglés, “Golgi-localized, γ -ear-containing, ARF-binding proteins”) son proteínas monoméricas que intervienen en el transporte vesicular entre TGN y endosomas de una forma muy similar a las APs (181–185).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas APs interactúan con otras proteínas involucradas en el transporte a través de las subunidades β y γ/α . AP1 interactúa con componentes de la proteína motora Kinesina-1 (186) y Kinesina-3 (187). La superfamilia de proteínas kinesina (KIFs) constituye un grupo de proteínas involucradas en el transporte celular de macromoléculas, vesículas y organelas (188–190). La acción motora ejercida por las KIFs es dependiente de ATP y microtúbulos. Los sitios de hidrólisis de ATP y adhesión a microtúbulos son parte del dominio motor de las kinesinas y se encuentran altamente conservados en organismos eucariotas (189,191,192). Sin embargo, el reconocimiento de los cargos movilizados por las kinesinas está dado por interacciones por fuera del dominio motor (187,193). Actualmente, en humanos, se conocen 45 KIFs que se agrupan en 14 subfamilias (194). Existen tres grandes grupos de kinesinas divididas según la posición del dominio motor: las que poseen el dominio en el extremo amino terminal son N-kinesinas; en el carboxilo terminal, C-kinesinas; y en el medio, M-kinesinas. La posición del dominio motor determina la direccionalidad del movimiento: las N-kinesinas se mueven desde el centro celular hacia la periferia, las C-kinesinas realizan el movimiento inverso a las N-kinesinas y las M-kinesinas depolimerizan los microtúbulos mientras mueven los cargos (195,196). Según criterios estructurales, funcionales y filogenéticos, las KIFs se agrupan en 14 subfamilias, desde la Kinesina-1 hasta la Kinesina-14: 11 subfamilias de N-kinesinas, 2 de C-kinesinas y 1 de M-kinesinas (194,197).

La familia de la Kinesina-1 es conocida como la familia de la kinesina de cadena pesada (KHC, del inglés Kinesin Heavy Chain). KHC, fue la primera KIF en ser reportada (198,199) y forma heterotetrámeros formados por dos subunidades motoras KHCs y dos subunidades adaptadoras livianas (KLC, del inglés Kinesin Light Chain) (200). Existen tres formas de KHCs reportadas KIF5A, KIF5B y KIF5C, las cuales están altamente relacionadas. KIF5B se expresa de forma ubicua en muchos tejidos (201), mientras que KIF5A y KIF5C solo se expresan en tejido nervioso (191,198). Por otra parte, las subunidades KLC poseen dominios de tipo TPR que reconoce motivos triptófano ácido ([L/M]xW[D/E]) en proteínas cargo (203–208) u otras proteínas adaptadoras que forman parte de los complejos involucrados en el transporte de vesículas (186,209–211). Existen cuatro isoformas de KLC, codificadas por cuatro genes distintos. Según el Atlas de Proteínas Humanas (212), KLC1 se expresa mayormente en la corteza cerebral, KLC2 presenta expresión ubicua, KLC3 se expresa principalmente en glándulas salivales, esófago, piel, útero y testículos, cumpliendo funciones altamente relevantes en testículos (213), mientras que KLC4 presenta expresión ubicua y es importante en sistema nervioso (214).

En cuanto al transporte intracelular organela-específico regulado por kinesinas, se sabe que tanto Kinesina-1 como Kinesina-2 están involucradas en el transporte bidireccional entre RE-Golgi (215,216), y el transporte entre TGN y membrana plasmática, estaría a cargo de KIFs de las familias Kinesina-1, Kinesina-3 y Kinesina-14 (112,187,217).

La TSH, como se mencionó anteriormente, es el principal regulador de la fisiología tiroidea. Por lo tanto, es uno de los principales reguladores de los mecanismos de transporte en la célula folicular tiroidea. Sin embargo, al día de la fecha, las proteínas involucradas en el transporte intracelular en epitelio tiroideo no son totalmente conocidas. Los estudios se han centrado principalmente en el transporte, estabilización y endocitosis del TSHR,

localizado en la membrana basolateral de la célula folicular tiroidea. En esta línea, es sabido que KIF3A, miembro de la familia de Kinesina-2, está involucrada en el transporte del TSHR hacia la membrana basolateral y que su silenciamiento conduce al desarrollo de hipotiroidismo congénito en ratones debido a la deslocalización del TSHR de la membrana plasmática basolateral y, consecuentemente, a la pérdida de la señalización de TSH mediada por su receptor (218). Si bien se desconoce qué clases de proteínas adaptadoras interactúan con el TSHR, se sabe que posee una señal no clásica de transporte basolateral en la región carboxilo terminal entre los residuos 731-746 (219). Además, el TSHR es rápidamente internalizado luego de su interacción con TSH en vesículas recubiertas de clatrina (220,221), proceso que podría estar mediado por AP2.

1.9.4 Estabilización y retención en la membrana plasmática

Muchas proteínas de membrana requieren de interacciones con proteínas estructurales o de andamiaje, que se encuentran ancladas en las membranas, para mantenerse en su correcta localización final de membrana. Los dominios PDZ (del inglés “Post-synaptic density protein, PSD-95, *Drosophila* septate junction protein Disc-large, tight junction ZO-1 protein”) son dominios de 80-90 aminoácidos involucrados en interacciones proteína-proteína que se encuentran presentes en varios polipéptidos. Aquellas proteínas que contienen dominios PDZ usualmente interactúan con las regiones citoplasmáticas de proteínas transmembrana que poseen motivos PDZ (156). El transporte, estabilidad y/o actividad de gran variedad de receptores, transportadores y canales está influenciado por interacciones con proteínas con dominios PDZ (222–226). Los motivos PDZ de proteínas transmembrana se localizan en la última región del extremo carboxilo terminal (227). Los dominios PDZ son capaces de reconocer hasta siete clases diferentes de motivos PDZ de interacción (228). Si bien poco se conoce sobre los mecanismos de reconocimiento entre los dominios PDZ y los motivos PDZ, análisis estructurales de estos dominios cristalizados junto con péptidos de interacción han permitido conocer y subdividir los tipos de motivos que reconocería cada dominio PDZ (229,230). Al día de la fecha, existen 16 clases de motivos tipo PDZ clasificados según las características de los aminoácidos que lo constituyen (230).

En particular en la glándula tiroidea, el TSHR posee un motivo PDZ tipo 1 formado por los últimos tres aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína (TVL). Este motivo interactúa con dominios PDZ de la proteína SCRIB, lo cual favorece la estabilización del TSHR en la membrana basolateral (231). La proteína SCRIB ha sido ampliamente estudiada en la embriogénesis de *Drosophila* (232). La proteína homóloga en mamíferos forma parte del complejo celular Scribble junto con las proteínas Lgl (del inglés “Lethal Giant Larvae”) y Dlg (del inglés “Disc large”). Además, SCRIB posee dieciséis zonas ricas en repeticiones leucina (LRR) y cuatro dominios PDZ. Al poseer estas dos clases de dominios, SCRIB pertenece a la familia de proteínas LAP (del inglés “LRR And PDZ”) (232). El dominio LRR es el que ancla a SCRIB a la membrana (233), mientras que los dominios PDZ son superficies de interacción con otras proteínas. SCRIB interactúa con TSHR por medio de sus dominios PDZ, inhibiendo su endocitosis basal y promoviendo su reciclado, procesos mediados también por el factor beta interactivo de PAX (β PPIX), proteína activadora de ARF GTPasas (GIT1) y el factor de ribosilación 6 (ARF6) (231). Este constituye el principal reporte sobre la relevancia de la interacción proteína-proteína mediada por motivos y dominios PDZ en la fisiología tiroidea. También existen estudios que indican que las proteínas proteína similar rhotina (p76RBE) y tafazina (TAZ) podrían interactuar mediante dominios y motivos

PDZ regulando la fisiología y homeostasis de la glándula tiroides (234,235) aunque su rol e importancia en dichos procesos aún no han sido validados.

1.9.5 Disfunción del transporte intracelular y patogenia

La correcta regulación del sistema de transporte intracelular es esencial para el buen funcionamiento celular y, en un nivel de organización superior, el organismo en su totalidad. Alteraciones en el sistema de transporte producen una desregulación de la homeostasis celular dando lugar a diversas patologías dependiendo de cuales sean los genes afectados. Puede ser que se produzcan mutaciones en señales de transporte de las proteínas cargo, mutaciones o señales que inactiven o alteren la funcionalidad de proteínas adaptadoras o motoras, como también mutaciones o desregulaciones de proteínas involucradas en la regulación de los procesos de transporte (236,237). Mutaciones en genes involucrados en los procesos de transporte están mayormente representadas en proteínas cargo dado que son más numerosos y muchos de ellos son tejido específico y no esenciales para la sobrevivencia del embrión (238). Por el contrario, mutaciones en genes que codifican para proteínas ubicuas de la maquinaria de transporte son en general letales. Sin embargo, mutaciones en dichos genes han sido reportadas y probablemente, dependiendo de las condiciones de cada tejido e individuo, puedan ser parcialmente compensadas debido a la gran plasticidad de la maquinaria de transporte (239).

Mutaciones en proteínas cargo pueden afectar el transporte a la membrana plasmática debido a disrupciones de señales de transporte, como es el caso del síndrome de Liddle causado por mutaciones en el canal de sodio epitelial (ENaC) (240), o debido a truncaciones de la proteína cargo que producen un incorrecto plegamiento o la pérdida de regiones esenciales para el transporte, como ocurre con algunas mutaciones clase II de la proteína transmembrana reguladora de la conductancia en la fibrosis quística (CFTR), en las cuales se ha reportado la pérdida de motivos di-acídicos asociados al transporte de la proteína desde el RE al Golgi, dando lugar a cuadros de fibrosis quística (241). En algunos casos, las mutaciones en las proteínas cargo pueden producir la acumulación de la proteína en el RE y desatar por lo tanto mecanismos de respuestas a proteínas mal plegadas o estrés de retículo (en inglés "unfolded protein response"). Si la cantidad de proteína acumulada en el RE excede la capacidad de los mecanismos de respuesta puede producirse daño y muerte celular (239). Esto ocurre en una forma de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, donde mutaciones en la proteína mielina abundante en periferia (CMTB1) conducen a estrés de retículo y la consecuente toxicidad en células de Schwann (242).

Como se mencionó anteriormente existen también mutaciones que afectan a las proteínas que forman parte de la maquinaria de transporte intracelular. Existen evidencias diversas que explican por qué mutaciones en estas proteínas de expresión ubicua solo afectan a órganos o tejidos específicos dando lugar a determinadas patologías. En muchos casos, los tejidos afectados expresan de forma predominante isoformas codificadas por los genes afectados, como en el caso de distrofias musculares debidas a defectos en Caveolina 3 (243), o el caso de la psoriasis pustular debida a defectos en la subunidad $\sigma 1C$ del complejo AP1 (244).

En otros casos, parece que los tejidos afectados poseen una alta demanda de la proteína codificada por los genes afectados por la mutación, como por ejemplo en la enfermedad de Anderson en donde defectos en la

GTPasa Sar1B conducen a la acumulación de grandes partículas en RE (245–247). También puede ocurrir que el tejido afectado posea una alta demanda y una alta eficiencia de la maquinaria de transporte mediada por la proteína particular en cuestión, como ocurre en la enfermedad desmielinizante de Charcott-Marie-Tooth causada por un defecto en genes de expresión ubicua como MTMR2, MTMR13 y FIG4 (fosfatasas de fosfoinositol) y SH3TC2 (239).

Además de mutaciones en los genes codificantes para las proteínas involucradas en el transporte intracelular, puede también producirse una desregulación de los mecanismos de transporte intracelular debido a alteraciones en otros genes. El ejemplo más claro de una patología con esta particularidad es el cáncer. En particular, la desregulación de la maquinaria de transporte favorece la transición epitelio-mesénquima y la capacidad migratoria de la célula tumoral (97), quedando así demostrada la importancia de la correcta regulación de los mecanismos de transporte intracelular.

2. Hipótesis y objetivos

Entre un 10-20% de los tumores tiroideos y el 30-40% de las metástasis provenientes de tumores primarios capaces de acumular yoduro, presentan refractariedad al tratamiento con yoduro radioactivo (71). Indefectiblemente, la pérdida de la acumulación de yoduro se asocia a un mal pronóstico; pacientes con cáncer de tiroides metastásicos capaces de acumular yoduro demostraron una tasa de supervivencia a los 10 años de ~56%, mientras que la cifra se reduce drásticamente a ~10% en pacientes cuyas metástasis pierden esta capacidad. Paradójicamente, la evaluación de la expresión proteica de NIS en muestras histológicas obtenidas de tumores tiroideos diferenciados capaces e incapaces de acumular yoduro demostró que 70-80 % de los tumores expresan niveles normales e incluso aumentados de NIS en comparación con el tejido normal adyacente, aunque la expresión es evidente principalmente a nivel citoplasmático (76,79). Estos resultados sustentan las bases que indican una correlación entre la disminución en la capacidad de acumular yoduro y la alteración en la localización de NIS en la membrana plasmática. La retención intracelular del transportador se debería principalmente a la desregulación de los mecanismos de transporte intracelular y estabilización de NIS en la membrana plasmática de la célula tumoral tiroidea. Desde una perspectiva terapéutica, no es suficiente que NIS se exprese, sino que conjuntamente debe ser apropiadamente localizado en la membrana plasmática para mediar la acumulación de yoduro. Por lo tanto, para el desarrollo de estrategias que permitan recuperar su expresión a nivel transcripcional se necesita considerar ese hecho, ya que una deficiencia en el transporte a la membrana plasmática podría ser causa de fracaso terapéutico.

A pesar de la relevancia de la comprensión de los mecanismos que median la expresión de NIS en la membrana plasmática, poco se conoce sobre los procesos que regulan el transporte intracelular y la expresión de NIS en la membrana plasmática de la célula folicular tiroidea. Se sabe que la TSH regula la expresión de esta proteína tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (38,39), pero se desconocen a nivel molecular los mecanismos que median los procesos post-transcripcionales y post-traduccionales de expresión y localización de NIS. Por otra parte, reportes previos de la mutante S509RfsX6 (S515X) NIS (64), identificada en un paciente con ITD, demuestran la importancia de la región distal de la proteína en su proceso de expresión en la membrana plasmática. Particularmente, el carboxilo terminal se constituye como la región citoplasmática más extensa de la proteína por lo cual contendría determinantes moleculares claves para el transporte intracelular. Estudios previos identificaron, mediante un programa bioinformático, la presencia de múltiples motivos cortos de aminoácidos en el carboxilo terminal, aunque ninguno de ellos fue revelado como determinante para la expresión de NIS en la membrana plasmática (65). Sin embargo, la creciente identificación de nuevos motivos aminoacídicos y la demora en la cura de las bases de datos de los programas utilizados para búsqueda de los mismos, genera un problema para la correcta identificación de todos los posibles motivos de aminoácidos relevantes para la fisiología de una dada proteína.

En base a los antecedentes planteados, el objetivo general de la presente tesis se focaliza en estudiar el mecanismo de transporte intracelular responsable de la expresión de NIS en la membrana plasmática en condiciones fisiológicas normales. En este sentido, se han establecido los siguientes objetivos particulares, a saber:

- Estudiar la presencia de motivos cortos de aminoácidos en el carboxilo terminal de NIS involucrados en el proceso de transporte de dicha proteína a la membrana plasmática.
- Identificar proteínas que interaccionen con NIS y regulen su proceso de expresión en la membrana plasmática.
- Evaluar el impacto de mutaciones de NIS, identificadas en pacientes con hipotiroidismo congénito sospechado de ser causado por defecto en el transporte de yoduro (ITD), en el proceso de transporte intracelular de NIS.

3. Materiales y métodos

3.1 Pacientes y secuenciación del gen *slc5a5*

El ADN genómico de los pacientes en estudio fue obtenido de leucocitos circulantes en sangre periférica utilizando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega). El análisis de la secuencia del gen *slc5a5* se realizó mediante amplificación por PCR de los exones codificantes (Tabla 1) y posterior secuenciación por el método de Sanger en electroforesis capilar (Macrogen, Corea del Sur) (47,61). La posición de los nucleótidos en el ARN mensajero de NIS humano se designó de acuerdo con la secuencia de referencia NM_000453. El protocolo de investigación clínica ha sido evaluado y aprobado por los comités de ética del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires) y del Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba). El estudio se realizó con el consentimiento informado por escrito de los pacientes y/o sus tutores antes de su inclusión en el estudio.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los exones del gen *slc5a5* y posterior secuenciación.

Primer	Secuencia	Producto
Exon 1.1-F	GCCTGTCTGTCCCAGTCCAG	541 pb
Exon 1.1-R	TAGTCCCAGGCTCCGAAGGT	
Exon 1.2-F	CTCCCCCGCTTGAGCAC	511 pb
Exon 1.2-R	CCTGTACAGCGGCCAAAG	
Exon 234-F	GGGCCACCTAGAGAGCAGA	756 pb
Exon 234-R	AAGCCAGAGTCTCCCCACA	
Exon 5-F	GGCATCAGTCCTAGGCACCA	471 pb
Exon 5-R	AGCAATCCTCCAGCCTCAGC	
Exon 67-F	AACCCACTCAAATGTCCCCTA	617 pb
Exon 67-R	CTGGCCTCCTCTCAGCTCTTTC	
Exon 8-F	TCTGAGCCCTGTCCGTCTTG	267 pb
Exon 8-R	ATGGCAGGCCAGGATAAGGA	
Exon 910-F	GGAGGGGAGGGGCAAATATC	452 pb
Exon 910-R	CCCCACCTCTCAGGAGACCA	
Exon 1112-F	TCCCAGCGGGTAAACTGAGG	580 pb
Exon 1112-R	GCCTTTGCACCTACCGTTCC	
Exon 13-F	CAGTTGGGGGAAGGAAGCAG	288 pb
Exon 13-R	GGTGGAGCCTTGAGGCAGAG	
Exon 14-F	TTGCCAGGGTCCCCTTAGTGG	363 pb
Exon 14-R	GCGATGGAGAAAGGTGCTGA	
Exon 15.1-F	TCCCGCCAGGTCATCAGTAG	620 pb
Exon 15.1-R	GAGGTTGCAGTGAGCCGAGA	

3.2 Plásmidos

Los plásmidos pcDNA3.1 conteniendo la secuencia que codifica para HA-hNIS y HA-rNIS fueron generosamente provistos por la Dra. Nancy Carrasco (Yale University School of Medicine, EE.UU.). Las mutantes V580A, L587A,

V588A, L612A, E578_K618del, K618_G634del y T641X hNIS provistas generosamente por el Dr. Thierry Pourcher (University Nice Sophia, Francia) fueron clonadas desde el vector de expresión pcDNA5 en el vector de expresión pcDNA3.1. Brevemente, la porción amino terminal fue amplificada mediante PCR con la utilización del oligonucleótido sentido (CACAGGTACCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGAGGCCGTGGAGACC) conteniendo un sitio de corte para KpnI y la etiqueta Hemaglutinina (HA) y el oligonucleótido antisentido (CACATCTAGAGGTTTGTCTCCTGCTG) conteniendo un sitio de corte para XbaI. Posteriormente estos fragmentos fueron ligados en el vector pcDNA3.1(-) (Invitrogen). El correcto clonado de estos plásmidos fue verificado mediante secuenciamiento directo (Macrogen).

Los oligonucleótidos codificantes para secuencias de silenciamiento dirigidas contra KLC2 (CAGCTCTCTTAACCTCCTTAA) fueron hibridados *in vitro* y posteriormente insertados en el vector pLKO.1 (Addgene). El correcto clonado de la secuencia fue verificado mediante secuenciamiento directo (Macrogen).

Los plásmidos psPAX2 y pMD2.G, necesarios para la generación de partículas lentivirales, el plásmido px459v2, necesario para la edición genómica mediante la técnica de CRISPR/Cas9, y el plásmido pEGFP fueron adquiridos en Addgene.

El plásmido codificante para la proteína verde fluorescente unida a KLC2 (GFP-KLC2) fue generosamente provisto por el Dr. Mark Dodding (University of Bristol, Reino Unido). Los plásmidos codificantes para Rab5-GFP, Rab7-GFP y Rab14-GFP y los plásmidos CD63-GFP y Lamp1-GFP fueron gentilmente provistos por los Dres. Gustavo Chiabrando y José Echeñique (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), respectivamente. El plásmido codificante para GFP-SCRIB fue generosamente provisto por el Dr. Thierry Pourcher (University Nice Sophia, Francia). El plásmido pLKO.1-shSCR (CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG) fue generosamente provisto por el Dr. Gastón Soria (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

3.3 Cultivo celular

Las líneas celulares derivadas de tiroides de rata Fischer FRTL5 y PCCL3 fueron generosamente provistas por la Dra. Nancy Carrasco. La línea celular FRT derivada de tiroides de rata Fischer fue generosamente provista por la Dra. Pilar Santisteban (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, España). Ambas líneas celulares se cultivaron de manera similar a la descrita (248,249). Como medio de crecimiento se utilizó una mezcla en proporciones idénticas de Medio Eagle modificado por Dulbecco y la mezcla de nutrientes F12 (DMEM/F-12) (Gibco), suplementado con 5% v/v de suero de ternero inactivado por calor (GIBCO), 1 mUI/ml TSH bovina (generosamente provista por el Dr. Albert F. Parlow, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Hormone and Peptide Program, National Institutes of Health, EE.UU.), 10 µg/ml insulina bovina (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml transferrina bovina, 2 µmol/ml glutamina y antibióticos (100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml estreptomycin) (Sigma-Aldrich). El cultivo se realizó en condiciones de esterilidad en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ en aire a 37 °C.

Las células fueron subcultivadas a razón 1:8; se sembraron en placas de cultivo de 60 o 100 mm o en placas de pocillos múltiples de 6, 12 o 24 pocillos según el esquema experimental, y se cultivaron hasta llegar a un 60-

70% de confluencia en medio de crecimiento. En caso de realizar experimentos con deprivación de TSH, se reemplazó el medio de crecimiento durante 5-7 días por uno de idéntica composición pero carente de TSH y conteniendo suero al 0.2 % v/v hasta el momento de iniciar los experimentos.

La criopreservación del cultivo celular fue efectuada en vapor de nitrógeno líquido en una solución conteniendo 50% de medio de crecimiento, 45% de suero fetal bovino y 5% dimetilsulfóxido (DMSO).

La línea celular MDCK-II fue generosamente provista por la Dra. Nancy Carrasco y el Dr. Enrique Rodríguez-Boulan (Weill Cornell Medical College, EE.UU.). La línea celular MDCK-II μ 1BKD fue provista generosamente por el Dr. Enrique Rodríguez-Boulan. Las líneas celulares MDCK-II y HEK293T (provistas por el servicio de cultivo celular institucional) fueron cultivadas en Medio Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM-HG), suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino inactivado por calor (NATOCOR), 2 μ mol/ml glutamina y antibióticos (100 U/ml penicilina G, 100 μ g/ml estreptomycin). Se cultivaron en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ en aire a 37 °C. Las células fueron subcultivadas a razón 1:10, se sembraron en placas de cultivo de 60 o 100 mm o en placas de pocillos múltiples de 6, 12, 24 o 96 pocillos según el esquema experimental y se cultivaron hasta llegar a un 60-90% de confluencia en medio de crecimiento. Su criopreservación fue efectuada en vapor de nitrógeno líquido en una solución conteniendo 50% de medio de crecimiento, 45% de suero fetal bovino y 5% dimetilsulfóxido (DMSO).

Para la generación de monocapas de células epiteliales polarizadas, células MDCK-II y FRT fueron sembradas en filtros 12-mm Transwell de polyester con un tamaño de poro de 0,4 μ m (Corning) a una densidad inicial de 250000 células. Las células fueron cultivadas por 7-9 días en el caso de MDCK-II y 4-5 días en el caso de FRT, de manera tal de diferenciar los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática.

3.4 Ensayos de transfección y generación de líneas celulares estables

Las líneas celulares fueron transfectadas de forma transiente con el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo protocolos y recomendaciones indicadas por el fabricante. Se utilizaron cultivos en placas de 100 mm, 60 mm o 6-pocillos dependiendo del caudal celular necesario para la actividad experimental. A tal fin, los cultivos celulares fueron transfectados a una densidad del 80 a 90% en medio de cultivo OptiMEM (Invitrogen). Los complejos ADN:Lipofectamina fueron incubados con el cultivo celular durante 6 h. Finalizada la incubación, el medio OptiMEM fue retirado y reemplazado por medio de crecimiento. A las 24 hs se procedió a la realización del experimento.

Las líneas celulares estables policlonales MDCK-II y FRT HA-hNIS y sus diferentes mutantes, se generaron mediante tratamiento con el antibiótico de selección G418 cuya resistencia es codificada en el vector de expresión pcDNA3.1 (Addgene). Brevemente, células MDCK-II o FRT fueron transfectadas con el plásmido de expresión de la proteína en estudio. A las 24 hs post-transfección se adicionó 1 g/l, en el caso de células MDCK-II, o 0,5 g/l, en el caso de células FRT, del antibiótico de selección G418 (AG Scientific Inc.) al medio de crecimiento. El cultivo se mantuvo en crecimiento en presencia de G418, cambiando el medio cada 3 días para

remover células muertas no transfectadas, durante 7 a 17 días hasta observar un crecimiento homogéneo del cultivo. Finalizado el período de selección, se evaluó la expresión de la proteína en estudio.

3.5 Captación de yoduro

Las células en cultivo sembradas en placas múltiples de 24 pocillos, en el caso de la línea celular HEK293T la placa fue previamente tratada con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich), fueron incubadas en el medio de cultivo, suplementado con 20 μM KI y 25 mCi/mmol I^- (PerkinElmer) a 37 °C durante 30 min. Finalizado el período de incubación, las células fueron lavadas 2 veces con solución salina balanceada de Hank (HBSS) frío a fin de eliminar la radiactividad no incorporada. El $^{125}\text{I}^-$ acumulado en las células fue extraído mediante la incubación con etanol frío al 95% durante 20 min a 4°C. La radiación incorporada por las células fue determinada mediante un contador gamma Triathler Gamma Counter (Hidex, Finlandia). Los resultados fueron expresados como pmol de yoduro por μg de ADN celular (pmol $\text{I}^-/\mu\text{g}$ ADN). Luego de la extracción etanólica, el contenido celular no extraído se sometió a precipitación con ácido tricloroacético al 5% durante 20 min a 4°C. El material precipitado se incubó con reactivo de difenilamina (0,714 % p/v difenilamina, 70% v/v ácido acético, 1,4 % v/v ácido sulfúrico, 0,0036 % v/v acetaldehído) a temperatura ambiente durante 12-16 hs. Posteriormente, el complejo coloreado se evaluó espectrofotométricamente a 595 nm. La concentración de ADN presente fue calculada por comparación con una curva testigo de ADN de esperma de salmón. Los datos de captación fueron normalizados según la eficiencia de transfección calculada mediante citometría de flujo.

3.6 Obtención de extractos proteicos totales

Las células adheridas a la placa se despegaron mecánicamente en PBS, se centrifugaron, se resuspendieron en 150 μl de buffer para lisados totales celulares [50 mM HEPES (pH 7), 2 mM MgCl_2 , 250mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,1% Nonidet 40] suplementado con inhibidores de proteasas (1mM DTT, 1mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatina A, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina) y se incubaron durante 15 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a 10.000 xg durante 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se lo conservó a -70°C. Las cuantificación proteica de los extractos generados se realizó mediante la técnica de Bradford (250) utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

3.7 Western blot (WB)

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y el análisis ulterior por inmuno-marcación fueron realizados como se describió previamente (251) con ligeras modificaciones (252), utilizando el sistema Mini-Protean (Bio-Rad). Se utilizaron entre 20 y 50 μg de extractos proteicos totales, dependiendo de la proteína en estudio. Dichos extractos fueron resuspendidos en buffer de lisis para homogenizar el volumen y mezclados con buffer de siembra [62 mM Tris (pH 6.8), 10 % v/v glicerol anhidro, 2 % p/v SDS, 0,1 M DTT, 0,004 % azul de bromofenol). Las muestras así preparadas fueron colocadas en baño termostatzado a 37°C durante 30 minutos o a 100°C durante 5 minutos para permitir la desnaturalización y reducción de las proteínas, enfriadas en hielo e inmediatamente sembradas en el gel resolutivo (6, 10 o 12% dependiendo del tamaño de la proteína en estudio). La corrida electroforética se realizó a 100 V constantes

durante períodos variables (2-3 horas) en solución de corrida conteniendo 192 mM glicina, 25 mM Tris (pH 8,8) y 0,1% SDS. Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa 0.45 μm de poro (Schleicher y Schuell) en buffer de transferencia [192 mM glicina, 25mM Tris (pH 8,8), 20% Metanol] sometidas a una diferencia de potencial constante de 100 V (250-350 mA, 30-40 W) durante 60 min. Las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo TBS-Tween suplementado con 5% seroalbúmina humana [100 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20] durante 60 min a temperatura ambiente bajo agitación permanente. Las membranas bloqueadas fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés (Tabla 2) diluidos en solución de bloqueo por 1 a 2 hs a temperatura ambiente, o bien durante toda la noche a 4°C, con agitación suave. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween a temperatura ambiente. La inmuno-detección del anticuerpo primario se realizó por incubación con un anticuerpo secundario capaz de reconocer el isotipo del anticuerpo primario utilizado conjugado a fluoróforos IRDye (680LT) o VRDye (800CW) diluido en solución de bloqueo (Tabla 2) por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. El exceso de anticuerpo secundario fue eliminado mediante lavados con TBS-Tween. Las bandas reactivas fueron visualizadas por revelado de la fluorescencia de los fluoróforos asociados a anticuerpos secundarios mediante el equipo Odyssey (LI-COR Biotechnology). La intensidad de las bandas fue determinada por densitometría mediante el software de análisis de imágenes ImageJ (National Institutes of Health).

3.8 Citometría de flujo y Separación celular activada por fluorescencia

Células MDCK-II fueron despegadas de la placa de cultivo con tripsina y fijadas en PBS conteniendo 2% p/v de paraformaldehído. 5×10^5 células/tubo fueron permeabilizadas, de ser necesario, en PBS conteniendo 0,2% saponina y 0,1% BSA, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos primarios anti-HA o anti-hNIS (Tabla 2). Posteriormente se realizaron lavados previos a la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra, ratón o conejo conjugados con Alexa 488 o de ratón conjugado con R-Phycoerythrin (Tabla 2). Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario en la marcación. La fluorescencia de 10.000 a 50.000 células teñidas fue analizada con el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA). La información obtenida fue analizada mediante el programa Flowjo (Tree Star, Ashland, OR). La intensidad de fluorescencia fue graficada en una escala logarítmica y los parámetros singulares se analizaron como histogramas.

En la separación de la población celular en estudio activada por fluorescencia (*Cell Sorting*) se utilizó un protocolo similar al utilizado en la marcación para el análisis por citometría de flujo, ya que las células no fueron fijadas ni permeabilizadas antes de la incubación con el anticuerpo anti-HA (5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y todos los procesos fueron realizados en condiciones de esterilidad. Los eventos positivos fueron recuperados utilizando el citómetro de flujo con capacidad de recuperar células BD FACS Aria Flow Cytometer (BD Biosciences). Luego del proceso de separación las células fueron centrifugadas, resuspendidas en medio de crecimiento y cultivadas como se describió previamente.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Anticuerpo	Isotipo	Catálogo-Fabricante	Uso (dilución)
Anti-hNIS ETNL	Conejo	Provisto por Dra. Nancy Carrasco	WB 1:3000 – IF y FACS 1:500
Anti-hNIS KELE	Conejo	Provisto por Dra. Nancy Carrasco	WB 1:3000 – IF y FACS 1:500
Anti-hNIS Vj1	Ratón	Provisto por Sabine Costagliola (Université libre de Bruxelles, Belgium)	IF y FACS 1:50
Anti-rNIS	Conejo	Provisto por Dra. Nancy Carrasco	WB 1:3000 – IF y FACS 1:500
Anti-HA tag	Rata	ROAHAHA – Roche – Sigma Aldrich	IF y FACS 1:500
Anti-HA tag	Conejo	C29F4 – Cell Signaling	WB 1:1000 – IF 1:500
Anti-GFP	Conejo	sc-8334 – Santa Cruz Biotechnology	WB 1:500 - IF 1:100
Anti-GFP	Ratón	11814460001 - Roche	IF 1:100
Anti-E-Cadherina	Conejo	24E10 – Cell Signaling	IF 1:100
Anti-βCatenina	Conejo	D10A8 – Cell Signaling	IF 1:100
Anti-GP135	Conejo	Provisto por Dr. Enrique Rodriguez-Boulan	IF 1:50
Anti-KDEL	Ratón	sc-58774 – Santa Cruz Biotechnology	IF 1:50
Anti-GAPDH	Conejo	FL-335 – Santa Cruz Biotechnology	WB 1:500
Anti-α-Tubulina	Ratón	T6074 – Sigma Aldrich	WB 1:400
Anti-KLC2	Conejo	HPA040416 – Atlas	WB 1:1000
Anti-T4	Conejo	11439724 – MP Biochemichals	IF 1:1000
Anti-TG	Conejo	A0251 – Dako – Agilent	IF 1:500
Anti-Rat Alexa Fluor 488	Cabra	A11006 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-Rat Alexa Fluor 633	Cabra	A21094 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-Rat PE	Cabra	A10545 – Molecular Probes – ThermoFisher	FACS 1:500
Anti-Mouse Alexa fluor 488	Cabra	A11001 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-Mouse Alexa Fluor 594	Cabra	A11005 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-Rabbit Alexa Fluor 488	Cabra	A11008 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-Rabbit Alexa Fluor 594	Cabra	A11012 – Molecular Probes – ThermoFisher	IF y FACS 1:500
Anti-Mouse IRDye (680LT)	Cabra	925-68020 – Licor	WB 1:15000
Anti-Rabbit VRDye (800CW)	Cabra	925-32211 – Licor	WB 1:15000

3.9 Inmunofluorescencia en líneas celulares

Las células fueron sembradas a baja densidad sobre cubreobjetos de 11 mm y fijadas en PBS conteniendo 2% p/v de paraformaldehído durante 15 min. De ser necesario, la permeabilización se realizó en solución de permeabilización y bloqueo [PBS (pH 7,4), 0,1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,2 % BSA, 0,1 % Triton X-100] durante 10 min. La incubación con anticuerpos primarios (Tabla 2) se realizó en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavados de las muestras con solución de bloqueo, se procedió a incubar durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 2). Se realizaron 3 lavados cada 5 min. con solución de bloqueo y los núcleos fueron teñidos con 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) durante 5 min. Posteriormente, se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos utilizando FluorSave (EMD Millipore.). En los experimentos se realizaron controles incluyendo la omisión de los anticuerpos primarios.

Las muestras fueron examinadas y fotografiadas a 600x de aumento con microscopio invertido confocal de fluorescencia (Confocal Fv1200 – Olympus Life Sciences). Los niveles de expresión proteica se expresaron (en unidades arbitrarias) como “densidad de tinción” y se calcularon realizando el cociente de la integración de la intensidad de fluorescencia por el número de células de cada campo microscópico. La integración de la intensidad de fluorescencia y el número de núcleos observados en un área seleccionada al azar de cada preparado se cuantificó utilizando el software ImageJ. En el caso del análisis de co-localización se utilizó el plugin “coloc2” de Fiji-ImageJ, circunscribiendo el análisis a la célula entera y utilizando el método de umbral por regresión de Costes (253). Se consideraron los valores de los coeficientes de Mander por encima del umbral de Costes. El análisis posterior se realizó utilizando el coeficiente de Mander M2 dado que este evalúa la colocalización de NIS (canal rojo) con respecto al marcador de organela-vesícula (canal verde).

La Transferencia de la Energía Resonante de Förster (FRET) por fotoblanqueo del aceptor se realizó utilizando los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 555 y el microscopio confocal Olympus Fv1200 (Olympus Life Sciences). Para esto se calibró la toma de las imágenes considerando que ninguno de los pixeles llegue a su nivel de saturación. Luego, se tomaron un total de seis fotos de cada experimento, tres antes del fotoblanqueo y tres luego del mismo. El fotoblanqueo se realizó mediante un pulso de 15 segundos a una intensidad de 50% del láser 559 nm. Luego del fotoblanqueo se corroboró que el aceptor disminuyó su intensidad de fluorescencia en un 90%. El análisis de las imágenes fue realizado mediante el software de adquisición de imágenes del microscopio y posteriormente con el software Fiji-ImageJ. La eficiencia de FRET fue calculada por medio de la ecuación 1.

$$E = 1 - \frac{Donor_{PreBleach}}{Donor_{PostBleach}} \quad (1)$$

3.10 Ensayos de co-inmunoprecipitación mediante GFP-Trap

Para realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación se co-transfectaron células MDCK-II o HEK293T con vectores de expresión codificando hNIS o las mutantes G561E y W565A/D566A y con un plásmido de expresión GFP o

GFP-KLC2. Las células transfectadas fueron posteriormente lisadas en buffer CHAPS (150 mM KCl, 50 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% CHAPS) y se prosiguió con el protocolo descrito por el fabricante (GFP-Trap ChromoTek). Brevemente, el lisado fue clarificado a 20.000 g y posteriormente incubado por 5 hs con esferas GFP-Trap® A previamente equilibradas en buffer de lavado. Luego se lavó 3 veces con buffer de lavado durante 2 min. y centrifugando a 2.500 g. Finalmente se eluyeron las muestras precipitadas utilizando sample buffer 2x y calentando las muestras a 70 o 100°C. Las muestras eluidas fueron sometidas a ensayos de Western Blot siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

3.11 Ensayo de ligación por proximidad (PLA)

Células HEK293T co-transfectadas con vectores de expresión codificando hNIS o las mutantes G561E y W565A/D566A y con un plásmido de expresión GFP o GFP-KLC2 fueron plaqueadas en cubreobjetos de vidrio de 11 mm recubiertos con poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich). Posteriormente, las muestras se fijaron con metanol durante 20 minutos a -20°C y se lavaron tres veces durante 5 min con PBS. Los pasos subsiguientes se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante (Duolink PLA – Sigma Aldrich). Brevemente, se realizó un bloqueo de las muestras por 1 h a 37°C con el buffer de bloqueo del kit Duolink PLA. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en la solución de dilución de anticuerpos primario provista por el fabricante e incubados con las muestras por 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavaron las muestras dos veces por 5 min con el buffer de lavado A provisto por el fabricante y se prosiguió con la incubación de las sondas positivas y negativas (1:5 en solución de dilución de anticuerpos) por 1 h a 37°C. Luego se procedió al paso de ligación. El buffer de ligación fue diluido 1:5 en agua de alta pureza libre de ARNasas y posteriormente se agregó la ligasa en una dilución 1:40. Esta preparación fue incubada en la muestra por 30 min a 37°C. Finalmente, se procedió al paso de amplificación utilizando el buffer de amplificación en una dilución 1:5 en agua de alta pureza libre de ARNasas y conteniendo la polimerasa en una proporción 1:80. Esta solución fue incubada con la muestra por 100 min a 37°C. La muestra fue montada en un portaobjetos con el líquido de montaje Duolink PLA mounting medium conteniendo Dapi y observada en microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems). La cuantificación de la señal fue realizada por medio del software Fiji-ImageJ.

3.12 Mutagenesis sitio-dirigida y deleciones

El desarrollo de mutaciones sitio-dirigidas y/o deleciones de secuencias de interés se realizó en base al método QuikChange (Stratagene) o mediante el método de PCR inversa. Luego de la realización de la PCR, los productos de PCR fueron digeridos con la enzima DpnI (Invitrogen). Los productos de PCR inversa fueron purificados y luego tratados con la enzima PNK ligasa (Invitrogen). Posteriormente, los productos fueron transformados en bacterias competentes y se procedió a la amplificación y purificación de plásmido de colonia única. La presencia de las mutaciones generadas fue confirmada mediante secuenciamiento directo (Macrogen). Los primers utilizados para la realización de mutagenesis sitio dirigida se encuentran detallados en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Primers utilizados para realizar mutagénesis sitio dirigida o deleciones parciales sobre la secuencia de NIS.

Secuencia Primer	Dirección	Mutante a generar
GGCCTGTCAGGCATCAGATGAGGGCTCCG	Fw	I546X
CGGAGCCCTCATCTGATGCCTGACAGGCC	Rv	
CTGAAGAACTCCCACTGGAACGCGGCCCCCTGGCTTCC	Fw	K600A/K601A
GGAAGCCAGGGGGCGCCGCTTTCCAGTGGGGAGTTCTTCAG	Rv	
CTGGAAACAAGAAGGCCGCTGGCTTCTGCCC	Fw	P602A/P603A
GGGCAGGAAGCCAGCGCCTTCTGTTTCCAG	Rv	
ACCCTGGCCCCGGAATTGTTGTG	Fw	G561E
CCACCACAACAATTCCGGGGCCA	Rv	
CCCACCACAACAATTGCGGGGCCAGGGTGC	Fw	G561Q
GCACCCTGGCCCCGCAATTGTTGTGGTGGG	Rv	
CCAGGCTCTCTCCGCGGTGGCAGTGTCT	Fw	L578A rNIS
AGACACTGCCACCGCGGAGGAGAGCCTGG	Rv	
GGGCACGATGTGGAGTAGAACCTCTGAGGGCGG	Fw	T641X rNIS
CCGCCCTCAGAGTTTCTACTCCACATCGTGCCC	Rv	
GACCAGCAGCAGGAGGCAGCAGCATAGAGGGCCCCGTTTA	Fw	TNL>AAA
TAAACGGGCCCTCTATGCTGCTGCCTCCTGCTGCTGGTC	Rv	
CCCCAAGGAAGAAGTGGCCGCCGCGGATGACAACCTGGTCAAG	Fw	I582A/L583A
CTTGACCAAGTTGTCATCCGCGCGGCCACTTCTTCTTGGGG	Rv	
GCACCCACTGGAACAAGAAGCCCC	Fw	L594A
TTCTTCAGGACCCTTGACCAAGTTGTC	Rv	
AACATCTTGAAGATCTGCCTGGAGTC	Fw	D331N
CAGCACCAGCAGAGGCATGTAC	Rv	
AAGACGCTGACCACTGTGCTGTG	Fw	G543R
CAGGGCACCGTAATAGAGATAGGAGAT	Rv	
CGATGCCTGACAGGCCCCACC	Fw	S547R
GATGAGGGCTCCGCACAGC	Rv	
CCCTGGCCCCGGGAATGTTGTGGTGG	Fw	L562M
CCACCACAACATTCGGGGGCCAGGG	Rv	
GCAGCACTCGCACGGCAGACAGCATC	Fw	W565A/D566A
CCACAACAATCCCGGGGCC	Rv	
GAAGAAGTGGCCATCCTGGATGAC	Fw	I546_E578del
GATGAGGGCTCCGCACAGC	Rv	
GATGACAACCTGGTCAAGGGTCTG	Fw	E578_L583del
CTTGGGGGCCACTGATGC	Rv	
GGACATGATGGTGGTTGAGACCAGCAGGAGA	Fw	R636X
TCTCTGCTGGTCTCAACCACCATCATGTCC	Rv	

3.13 Amplificación y purificación de plásmidos

Los diferentes plásmidos fueron transformados en células bacterianas competentes *Escherichia coli* cepa DH5alfa (*E. coli* DH5alfa) o Stb13 (*E. coli* Stb13) sensibles a ampicilina y kanamicina (Stratagene). Las colonias transformadas fueron seleccionadas por su resistencia al mencionado antibiótico. Para la preparación de células competentes, una colonia de la cepa bacteriana *E. coli* DH5alfa o Stb13 fue crecida en medio de cultivo YT broth durante toda la noche en agitación (200-250 rpm) a 37°C. Luego, 100 ml de medio YT broth se inocularon con el precultivo y se incubaron en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} 0.4-0.55. Una vez

alcanzada esta DO, el cultivo fue transferido a tubos falcon de 50 ml previamente enfriados y fueron mantenidos en hielo por 15 min. Las bacterias fueron centrifugadas a 1-500 g por 15 min. a 4°C y el sobrenadante descartado. El pellet se resuspendió en 34 ml de Buffer de Transformación 1 (pH 5.8, Rb Cl 100mM, MnCl₂.4H₂O 50 mM, KAc 30 mM, CaCl₂.2H₂O 10 mM y Glicerol 15%) y se incubó en hielo por 1 h. Luego, las bacterias fueron centrifugadas a 1-500 g por 15 min. a 4°C. El pellet se resuspendió en el Buffer de Transformación 2 (pH 7, MOPS 10 mM, RbCl 10mM, CaCl₂.2H₂O 75 mM y Glicerol 15%) y se incubó 15 min. en hielo. Posteriormente, las bacterias fueron alicuotadas y congeladas de forma inmediata en nitrógeno líquido.

La etapa de transformación se realizó incubando 100 µl de células competentes DH5alfa o Stbl3 con la construcción de interés (10-100 ng) durante 30 min en baño de hielo y posteriormente se realizó un golpe de calor a 42 °C durante 90 seg. Las bacterias transformadas fueron crecidas en medio LB no selectivo durante 60 min a 37 °C bajo agitación. Alícuotas de este cultivo (o bien el cultivo completo) fueron sembradas en medio LB sólido selectivo (100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina) y cultivadas a 37 °C durante 12-16 hs a fin de obtener las colonias bacterianas que incorporaron al plásmido. La extracción y purificación del ADN plasmídico se realizó utilizando el kit Wizard® Plus SV minipreps DNA purification system (Promega) y siguiendo instrucciones del fabricante. El material plasmídico resultante fue cuantificado mediante su absorbancia a 260 nm y se evaluó la calidad de la purificación mediante la relación de absorbancias 260/280 nm y su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

3.14 Generación de partículas lentivirales

Células HEK293T fueron transfectadas de forma transiente con los plásmidos psPAX2:pLKOshRNA:pMD2.G (Addgene) en una relación 5:5:1. Luego de la transfección el medio fue removido y cambiado por medio de crecimiento fresco. A las 48 hs, el medio fue removido y reemplazado nuevamente por medio de crecimiento fresco. Las partículas lentivirales fueron colectadas a 24 hs del último cambio de medio en el sobrenadante de las células transfectadas, y posteriormente congeladas a -80°C.

3.15 Silenciamiento de la expresión génica mediante ARN de horquilla corta (shRNA)

La línea celular FRTL5 fue transfectada con el plásmido pLKO.1-shKLC2 o pLKO.1-shSCR según el protocolo previamente descrito. A 24 hs de realizada la transfección se procedió a la selección utilizando Puromicina 1 mg/ml hasta la aparición de colonias estables. Posteriormente, se seleccionaron clones estables, a los cuales se les extrajo proteínas totales y se verificó el silenciamiento de KLC2 mediante WB. La línea celular PCCL3 fue transducida por medio de partículas lentivirales conteniendo los plásmidos pLKO.1-shSCR o pLKO.1-shKLC2. A 24 hs de realizada la transducción se procedió a la selección utilizando Puromicina 1 mg/ml, hasta la aparición de colonias estables. Posteriormente, se seleccionaron clones estables, a los cuales se les extrajo proteínas totales y se verificó el silenciamiento de KLC2 mediante WB.

3.16 Generación de células MDCK-II deficientes en SCRIB mediante CRISPR/Cas9

El diseño y posterior clonado de las secuencias ARN guías, dirigidos contra los exones 2 y 3 del gen que codifica para SCRIB de perro, (Guía 1: GGTGGCCAAC TTTATGCAGC. Guía 2: TGGAGATCGCGGACTTCAGT) en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)v2.0 (Addgene) fue realizado según protocolos descriptos (254). El correcto clonado fue evaluado mediante secuenciación directa (Macrogen). Los plásmidos conteniendo los mencionados guías fueron transfectados en la línea celular MDCK-II como se detalló anteriormente. A las 24 hs de transfección se reemplazó el medio de crecimiento por uno de igual composición conteniendo Puromicina 1 mg/ml y se incubó durante 72 hs. Posteriormente, se reemplazó el medio de selección por medio de crecimiento fresco, carente de Puromicina, hasta observar la formación de clones. Se procedió a la selección de clones y crecimiento individual escalado de cada uno de ellos durante 15 días. Posteriormente se extrajo ADN genómico de cada uno de los clones utilizando la técnica de extracción mediante bromuro de cetiltrimetilamonio según protocolos descriptos (255) y se amplificaron las regiones que comprenden los exones 2 y 3 del gen que codifica para SCRIB (Primers: Fw TGCGTCTGCTCCGGAGGG y Rv AGCAGGGGACCTCAGGTGTC). Los productos de amplificación fueron resueltos en un gel de agarosa para verificar el tamaño del producto y posteriormente purificados para su secuenciación. Se evidenció una eficiencia de edición génica del 20% para el guía 1 y del 50% para el guía 2. En todos los clones editados se genera una proteína trunca no funcional. Los experimentos posteriores fueron realizados con dos clones editados mediante el guía 2: clon 1 (S32Rfs23X SCRIB) y clon 2 (S32Kfs5X SCRIB/S32Lfs1X SCRIB).

3.17 Cría de peces cebra

La línea de pez cebra (*Danio rerio*) utilizada en el acuario del Instituto de Biología Molecular de Rosario donde se realizaron los experimentos es AB (<https://zfin.org/ZDB-GENO-960809-7>). Los peces juveniles y adultos se mantuvieron en peceras de cría de 30 a 90 litros con una densidad aproximada de un pez por litro de agua, utilizando un sistema de filtrado “dry-wet”, a temperatura entre 26 y 28°C, manteniendo ciclos de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad. Se utilizó agua potable filtrada por ósmosis reversa. Los peces adultos se alimentaron tres veces al día, alternando entre hojuelas secas y *Artemia sp.*

Este estudio se llevó a cabo en estricta conformidad con las normas nacionales e internacionales pertinentes. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, previamente aceptados por el Ministerio de Salud de la Nación Argentina.

3.18 Obtención de embriones

El día anterior al apareamiento, los peces reproductores se estimularon alimentándolos con una dosis mayor de *Artemia sp.* Por la tarde de ese día, se separaron machos y hembras, en una proporción de dos hembras por cada macho, en canastas de reproducción especiales (canastas de red que se emplean para evitar que los peces adultos ingieran los huevos depuestos) ubicadas en peceras de reproducción. A la mañana del día de la

puesta, se mezclaron machos y hembras. Luego de 30-40 minutos, se recolectaron los huevos pasándolos por un tamiz y se lavaron al menos tres veces con agua del sistema. Posteriormente, los embriones se depositaron en vasos de precipitado con medio de embriones (Medio E3: NaCl 0.2 mM, KCl 0.17 mM, MgSO₄ 0.33 mM, CaCl₂ 0.33 mM) hasta el momento de ser utilizados.

3.19 Microinyección y silenciamiento de *klc2* en embriones de pez cebra inyectados

Los embriones obtenidos por cruza naturales fueron inyectados en el estadio de 1-4 células en el vitelo inmediatamente debajo del blastómero, usando un equipo de microinyección manual, impulsado por aire (MPPI-3 Pressure Injector, Applied Scientific Instrumentation). Las agujas de inyección consistieron de capilares de vidrio (con filamento interior, diámetro externo: 1.2 mm, diámetro interno: 0.69 mm y longitud: 10 cm) estirados hasta el tamaño y punta deseados, utilizando un instrumento especial para esta tarea (Narishige, modelo PC-10). Cada una de las soluciones a inyectar, se cargó dentro de la aguja de inyección empleando una puntera especial (tips Eppendorf GELoading 0.5-20 µl) y micropipeta, momentos antes de la inyección propiamente dicha.

El Morpholino[®] utilizado para inducir la depleción de la proteína KLC2 es el MO-KLC2SPZB (GGGAAGCACAGGTGAAACACACACG) de Gene Tools (Philomath), dirigido contra el exón 2 y que interfiere el empalme del gen que codifica para KLC2. Dicho Morpholino[®] ya ha sido previamente utilizado y caracterizado (256). El MO-KLC2SPZB fue microinyectado en dosis de 2 y 4 ng por embrión. Como control de microinyección se utilizó el Morpholino[®] Control Standard (MO-GLO, CCTCTT ACCTCAGTTACAATTTATA) en idénticas condiciones al MO-KLC2SPZB. Este Morpholino[®] tiene como blanco una mutación generadora de empalme en la posición 705 en el pre-ARNm de beta-globina en reticulocitos de humanos talasémicos y por lo tanto no posee actividad en embriones de pez cebra.

Una vez inyectados, los embriones se colocaron inmediatamente en medio E3 fresco, el cual se renovó al menos 3 veces a lo largo del día de la inyección. Esto se realizó para evitar la contaminación del medio con bacterias y hongos que pudieran generarse y reproducirse por la muerte y/o coagulación de algunos embriones ocasionados por la inyección. Los embriones inyectados se dejaron recuperar en estufa a 28°C, y se mantuvieron a esa temperatura realizando cambios periódicos de medio hasta alcanzar las 120 horas pos-fecundación (hpf) (5 días), momento en el cual se procedió a realizar la evaluación de la funcionalidad tiroidea.

El defecto en el splicing de KLC2 se corroboró realizando RT-PCR (Primers: Fw CCACATTAGAAGTTTGAACCCCATCC, Rv GTTGGGTATTGCGCAGCTCG) y posteriormente se corrieron los productos en una electroforesis en agarosa al 2% y se observaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Todos los embriones fueron clasificados en sus estadios de acuerdo al desarrollo embrionario en hpf o días pos-fecundación (dpf) a 28.5°C y de acuerdo con criterios establecidos (257,258) utilizando una lupa estereoscópica Olympus (Olympus Life Sciences).

3.20 Inmunofluorescencia en Pez Cebra

Embriones de pez cebra de 120 hpf microinyectados con el morpholino control o anti-KLC2 fueron fijados con 4% paraformaldehído durante toda la noche a 4°C. Luego fueron lavados con PBS-Tween 0.1% (PBST) y tratados con proteinasa K (Roche) 10 µg/ml por 60 min a 37°C. Los embriones fueron lavados tres veces con PBST y luego incubados en buffer de bloqueo (PBST, 1% DMSO, 1% BSA, 5% suero de caballo y 0.8% triton X-100) por 2 hs. Luego los embriones fueron incubados durante toda la noche a 4°C en buffer de bloqueo conteniendo el anticuerpo primario (Anti-T4 o Anti-Tg, ver Tabla 2). Posteriormente al lavado con PBST 1% BSA, los embriones fueron incubados ON a 4°C en buffer de bloqueo conteniendo anticuerpos secundarios (Tabla 2). Los embriones fueron montados en cubreobjetos utilizando glicerol o metilcelulosa como líquido de montaje y observados en microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems). La cuantificación de la señal fue realizada por medio del software Fiji-ImageJ.

3.21 Extracción de ARN de Pez Cebra

El procedimiento de extracción de ARN total de embriones de pez cebra fue realizado en base al método descrito (259). Para cada punto experimental se utilizaron 25 embriones. Los embriones fueron lisados en 0.5 ml de TRIzol (ThermoFisher). Luego se adicionó 0,2 ml de cloroformo por ml de lisado, la mezcla se agitó vigorosamente, se incubó 5 min a temperatura ambiente y fue centrifugada a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. El ARN presente en la fase acuosa superior fue recuperado, precipitado con isopropanol y centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 15 min. El precipitado se lavó con etanol 75%, se centrifugó a 8000 xg por 15 min a 4°C, fue secado en estufa a 37°C y finalmente disuelto en agua libre de nucleasas. Posteriormente se procedió a la evaluación de la concentración de la solución de ARN mediante su absorbancia a 260 nm. Se determinó la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm para evaluar la calidad de la muestra obtenida. Posteriormente se evaluó la integridad del material extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.22 Modelado molecular y análisis bioinformático

Motivos aminoacídicos lineales fueron predichos mediante la utilización del software Eukaryotic Linear Motif (ELM) (<http://elm.eu.org>) (260) o mediante la utilización de un script para python3 desarrollado utilizando el módulo de Expresiones Regulares. Los alineamientos múltiples de secuencias fueron realizados mediante el software Clustal-Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (261) o T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/>) (262). El modelo de homología de NIS fue realizado utilizando como templatado la estructura cristalina del cotransportador de sodio/galactosa de *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT) (PDB ID: 2XQ2) (263) y el transportador de benzil/hidantoina de *Microbacterium liquefaciens* (Mhp1) (PDB ID: 2JLN) (264). El péptido conteniendo el motivo monoleucina de NIS (P576-D584) en complejo con la subunidad σ 1 de AP1 (PDB ID: 4P6Z) (265) fue modelado utilizando el software MODELLER. De manera similar se modeló el péptido conteniendo el motivo triptofano ácido de NIS (P560-D566) en complejo con la proteína KLC2 (PDB ID: 3ZFW) (209). Las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas a través del paquete Amber molecular dynamics (266) y el campo de fuerza en agua como ha sido reportado (267). La interacción del complejo del péptido de NIS con AP1 fue simulado por 20 ns sin restricciones. Los cálculos de la energía de interacción

fueron realizados a partir de cálculos de mecánica molecular y del área de superficie generalizada de Born por medio de las trayectorias y el script MMPBSA.py del paquete de AmberTools. La interacción del complejo peptídico de NIS con KLC2 fue simulado por 100 ns sin restricciones. Los segmentos helicoidales libres fueron simulados por 100 ns manteniendo fijos los residuos 541-550. Los análisis de trayectoria y las imágenes fueron realizados por medio del software VMD (268). El modelo del complejo del motivo PDZ tipo 1 de NIS y el dominio PDZ 1 de SCRIB fue realizado basado en el cristal PDB ID: 5VWI (269) y posteriormente visualizado en el software VMD.

3.23 Gestión de residuos peligrosos

Se realizó en base a la normativa institucional, provincial y nacional establecidas en relación a la gestión de residuos peligrosos, Ley Nacional 24051: Residuos Peligrosos y documentos complementarios (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Presidencia de la Nación), Ley Provincial Nº 8973 (Agencia Córdoba Ambiente) y Resolución HCD 336/05: Gestión de Residuos Peligrosos (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba).

3.24 Análisis estadístico

El análisis de las diferencias múltiples entre grupos fue realizado por Análisis de Varianza (ANOVA). Los resultados se analizaron mediante estadística no paramétrica utilizando el test de Kruskal-Wallis y como post-test se utilizó el test de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas usando el test *t* de Student o el de Mann-Whitney para muestras no apareadas. Los test estadísticos fueron realizados con la utilización del software Prism 5.0 (GraphPad Software). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. Resultados

4.1 El carboxilo terminal es determinante para el transporte de NIS a la membrana plasmática

El transporte de proteínas integrales de membrana está determinado por señales de transporte codificadas en regiones desestructuradas expuestas al citosol y el reconocimiento de éstas por proteínas que asisten el proceso de transporte intracelular. El carboxilo terminal de NIS es la mayor región de la proteína expuesta al citosol. Según nuestro modelo de homología basado en la estructura del cotransportador de sodio/galactosa de *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT) (263) (Figura 5A), dicha región de NIS en humano (hNIS) está constituida por 97 aminoácidos, comenzando en el residuo I546 y finalizando en el residuo L643, abarcando casi un sexto de la longitud total de la proteína. Al día de la fecha, no se ha reportado ningún tipo de estructura secundaria estable en esta zona de la proteína por lo cual se constituye como una región blanco de señales de transporte o modificaciones post-traduccionales. Reportes previos sugieren que la región carboxilo terminal podría estar involucrada en los procesos de transporte intracelular de esta proteína dado que la mutante S509RfsX6 (S515X) NIS, identificada en un paciente con ITD, que carece del último segmento transmembrana y todo el carboxilo terminal, es retenida intracelularmente (64). La mutación identificada en el paciente conlleva a un cambio en el empalme de NIS debido a la aparición de un sitio de corte y empalme críptico que da lugar a la proteína trunca S509RfsX6 NIS. Sin embargo, si la eficiencia de reconocimiento de este nuevo sitio críptico de corte y empalme no es total, se obtendría también un ARNm maduro distinto que al traducirse daría lugar a la proteína Y531X NIS. A fin de estudiar la relevancia del carboxilo terminal de NIS en los procesos de transporte intracelular hacia la membrana plasmática, se analizó el efecto de la remoción del carboxilo terminal estudiando la mutante Y531X NIS y una mutante que carece únicamente de la región carboxilo terminal (I546X NIS).

4.1.1 El carboxilo terminal de NIS posee información relevante para el transporte intracelular de la proteína y su localización final en la membrana plasmática

A fines de comenzar nuestro estudio acerca de la relevancia de la región carboxilo terminal en los procesos de transporte intracelular de NIS, se procedió a transfectar de forma transiente el plásmido de expresión conteniendo el ADNc codificante para la proteína WT y la mutante Y531X NIS en la línea celular FRTL5, y posteriormente se evaluó la localización de la proteína por inmunofluorescencia marcando con un anticuerpo dirigido contra el epítipo HA localizado en el extremo amino terminal de la proteína. La línea celular FRTL5, proveniente de tiroides de rata Fischer, constituye el modelo celular de estudio de fisiología tiroidea por excelencia. Se observó que la mutante Y531X NIS presenta una localización intracelular, quedando retenida en compartimentos membranosos de aspecto reticular, en severo contraste con la localización de la proteína WT que se localiza en la membrana plasmática celular (Figura 5B). Estos resultados sugieren que el último paso transmembrana y el carboxilo terminal son importantes para el correcto transporte de NIS a la membrana plasmática.

Para corroborar que este defecto en el transporte de NIS a la membrana plasmática es consecuencia de la ausencia de la región carboxilo terminal, se generó la mutante I546X NIS que carece de todo el extremo carboxilo terminal. Se generaron células MDCK-II expresando de forma estable la mutante I546X NIS y se analizó la localización subcelular de la proteína. El ensayo de captación de yoduro fue realizado en presencia y ausencia del inhibidor competitivo de NIS perclorato (ClO_4^-), demostrándose que el transporte de yoduro es realizado de forma específica por NIS. Vale aclarar que las únicas células capaces de transportar yoduro son aquellas que expresan a NIS en la membrana plasmática, es por esto que esta técnica no solo sirve para estudiar la funcionalidad del transportador sino también su localización celular. Se observó que las células expresando la mutante I546X NIS pierden la capacidad de acumular yoduro (Figura 5C) en comparación con aquellas células transfectadas con la proteína WT. Esto podría deberse a un defecto funcional de la proteína mutante o a un defecto en su localización subcelular. Es por esto que se analizó mediante citometría de flujo y microscopía confocal la localización subcelular de dicha mutante realizando las tinciones contra el epítipo HA tanto en condiciones permeabilizadas (marca el total de la proteína en estudio que expresa la célula) como no permeabilizadas (únicamente marca las proteínas que se encuentran en la membrana plasmática). No se observó tinción de la membrana plasmática por inmunofluorescencia en condiciones no permeabilizadas, ni señal en citometría de flujo en condiciones no permeabilizadas al analizarse células transfectadas con el plásmido que codifica para la mutante I546X NIS (Figura 5D-F), a diferencia de lo observado para la proteína WT en donde pudo observarse señal tanto en la inmunofluorescencia como en la citometría de flujo en condiciones no permeabilizantes. Sin embargo, sí pudo observarse señal de la mutante I546X NIS tanto en la inmunofluorescencia como en la citometría de flujo realizadas en condiciones permeabilizadas (Figura 5D-F). Ensayos de inmunofluorescencia realizando una co-tinción con el marcador de RE anti-SEKDEL, permitieron identificar que la mutante que carece del carboxilo terminal de NIS queda retenida en el RE (Figura 5F). A fines de evaluar la relevancia del extremo carboxilo terminal de NIS en un contexto tiroideo se procedió a realizar una inmunofluorescencia con la línea celular FRTL5 transfectada con los plásmidos de expresión de WT NIS y la mutante I546X NIS. En dichas células transfectadas, se observó un patrón similar al observado en las células MDCK-II transfectadas (Figura 5G), es decir una expresión intracelular de la proteína mutante que co-localiza con el marcador de RE. Teniendo en cuenta estos resultados concluimos que el carboxilo terminal de NIS es relevante para el transporte intracelular de la proteína a la membrana plasmática de células tiroideas. Estos resultados indican que el extremo carboxilo terminal contiene determinantes moleculares indispensables para la correcta expresión de NIS en la membrana plasmática celular.

4.1.2 Las regiones comprendidas entre los residuos I546_E578 y E578_K618 son claves en el transporte de NIS a membrana plasmática

Con el propósito de identificar qué regiones del extremo carboxilo terminal son las de mayor relevancia en el transporte de NIS a la membrana plasmática, se realizaron deleciones parciales de la proteína eliminando secuencialmente distintas regiones del carboxilo terminal en un plásmido de expresión que codifica para HA-NIS. Se diseñaron cuatro mutantes particulares abarcando la longitud del carboxilo terminal de NIS: I546_E578del, E578_K618del, K618_G634del y G634_Q639del (Figura 6A). Los plásmidos de expresión de cada una de estas mutantes fueron transfectados de forma estable en la línea celular MDCK-II.

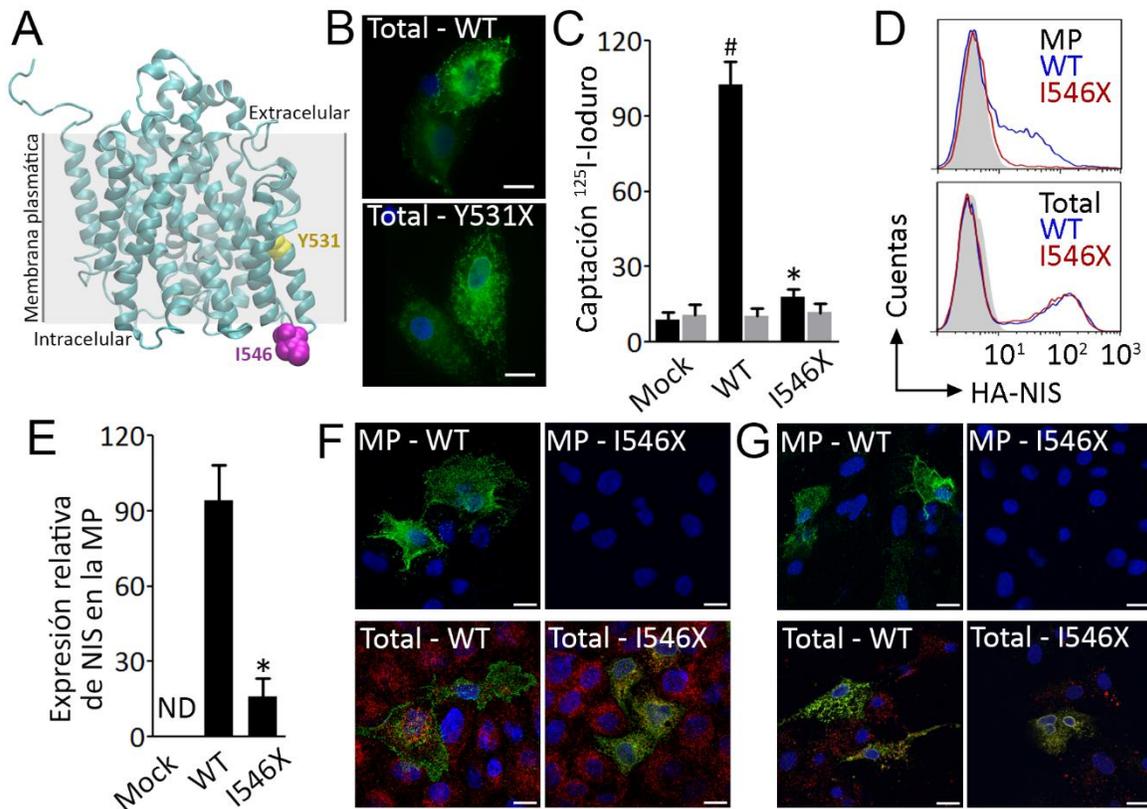


Figura 5. El carboxilo terminal de NIS es importante para su expresión en la membrana plasmática. **A.** Modelo de homología de NIS basada en la estructura de vSGLT (PDB ID: 2XQ2). Se detallan los residuos Y531 (amarillo) e I546 (magenta). **B.** Microscopía de fluorescencia analizando la localización de WT y Y531X NIS marcadas con anticuerpo anti-HA (verde) en células FRTL5 permeabilizadas. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm. **C.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT e I546X NIS. Perclorato inhibe la función de NIS (barras grises). Mock: células transfectadas con vector vacío. Los resultados se expresan en pmol ioduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **D.** Citometría de flujo analizando la expresión de WT e I546X NIS en células MDCK-II no permeabilizadas (MP: membrana plasmática) y permeabilizadas (total). **E.** Cuantificación de la expresión relativa de WT e I546X NIS en la membrana plasmática analizada mediante citometría de flujo ± SD. ND: Indetectable. *p <0.05 (Mann-Whitney t-test). **F y G.** Microscopía confocal analizando la expresión de WT e I546X NIS en células MDCK-II (F) y FRTL-5 (G) sin permeabilizar (MP: membrana plasmática) y permeabilizadas (total) marcadas con anticuerpos anti-HA (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm.

Al comenzar el estudio de las deleciones parciales del carboxilo terminal de NIS, se observó que las mutantes K618_G634del y G634_Q639del son capaces de transportar ioduro, aunque de una forma levemente menor en comparación con la proteína WT (Figura 6B). Además, se evidenció mediante microscopía confocal de fluorescencia en condiciones no permeabilizantes y a través de citometría de flujo en condiciones no permeabilizantes, que las mutantes K618_G634del y G634_Q639del se localizan en la membrana plasmática al igual que la proteína WT (Figura 6C y D). Por lo tanto, concluimos que la deleción de la región comprendida entre los residuos K618_Q639 no afecta el proceso de transporte de NIS a la membrana plasmática. Sin embargo, la remoción de las regiones comprendidas entre los residuos I546_E578 y E578_K618 produce un efecto notable en la localización subcelular de la proteína en comparación con WT NIS, observándose que ninguna de estas mutantes es capaz de transportar ioduro (Figura 6B) debido a que son retenidas de forma

intracelular como se evidenció mediante citometría de flujo y microscopía confocal de fluorescencia (Figura 6C-D). Además, mediante microscopía confocal se observó que ambas mutantes co-localizan con el marcador del RE anti-SEKDEL, lo cual sugiere fuertemente que estas mutantes son retenidas en el RE (Figura 6D).

Al igual que se realizó con la mutante I546X NIS, se procedió a evaluar la relevancia de las distintas regiones del carboxilo terminal en el transporte de NIS a la membrana plasmática en un contexto celular tiroideo. Para ello, se generaron células FRTL5 expresando establemente las deleciones en estudio y se analizó mediante microscopía confocal su localización. Las imágenes obtenidas se condicen con lo visualizado en células MDCK-II, observándose que las mutantes que carecen de las regiones I546_E578 y E578_K618 son retenidas a nivel intracelular en el retículo endoplásmico (Figura 6E). A partir de estos resultados concluimos que la región comprendida entre los residuos I546 y K618 es determinante para la salida de NIS del retículo endoplásmico, y su consecuente transporte a la membrana plasmática.

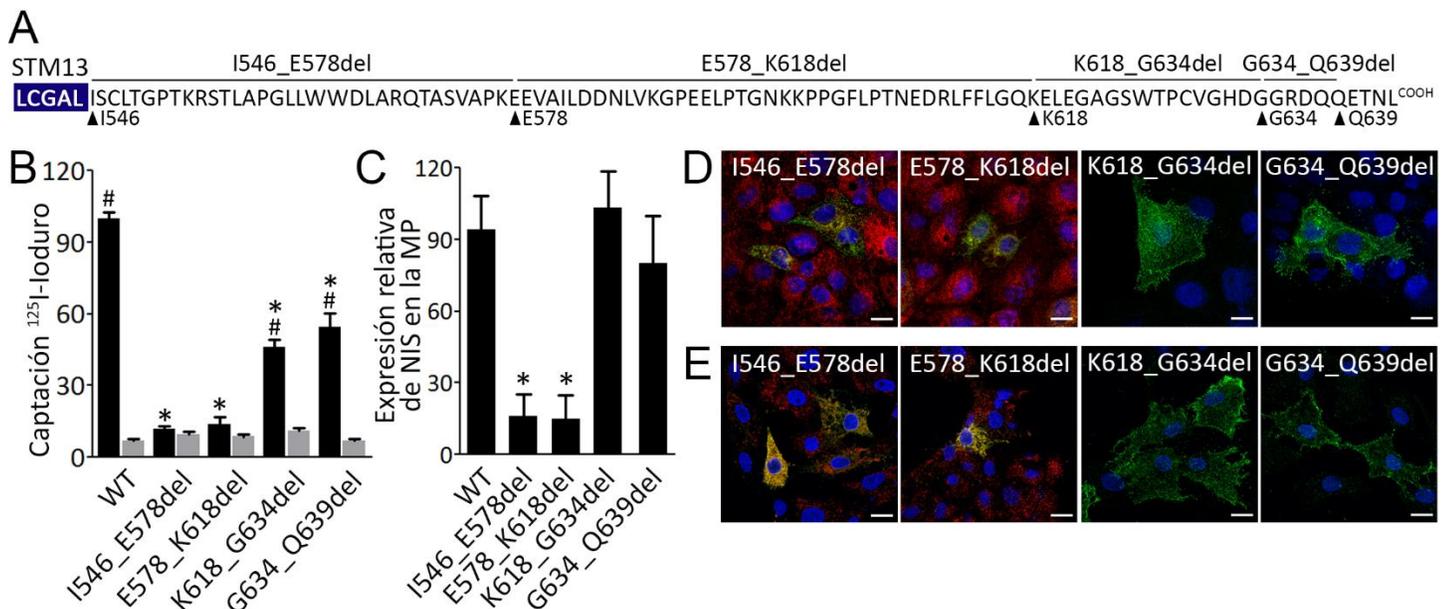


Figura 6. La región carboxilo terminal comprendida por los residuos 546-618 es importante para la expresión de NIS en la membrana plasmática. **A.** Esquema de la secuencia del carboxilo terminal de NIS humano indicando las deleciones generadas. El cuadro azul indica la secuencia del segmento transmembrana 13 de NIS. **B.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT NIS y las mutantes con deleciones del carboxilo terminal. Los resultados se expresan en pmol ioduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **C.** Cuantificación de la expresión relativa de WT NIS y las mutantes con deleciones del carboxilo terminal en la membrana plasmática analizada mediante citometría de flujo. *p<0.05 (ANOVA, Dunns post-test). **D y E.** Microscopía confocal analizando la expresión de WT NIS y las mutantes con deleciones del carboxilo terminal en células MDCK-II (D) y FRTL-5 (E) marcadas con anticuerpos anti-HA (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Las deleciones I546_E578del y E578_K618del fueron analizadas en condiciones permeabilizantes. Las deleciones K618_G634del y G634_Q639del fueron analizadas en condiciones no permeabilizantes. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm.

4.1.3 Identificación y evaluación de motivos lineales cortos en el carboxilo terminal de NIS

Como se mencionó anteriormente, el extremo carboxilo terminal de NIS es una región de desorden intrínseco, es decir desestructurada. Regiones de este tipo poseen motivos aminoacídicos que se constituyen como blancos de modificaciones post-traduccionales o señales de transporte intracelular que son reconocidas por otras proteínas para direccionar su localización subcelular y/o secreción en la célula. Con el objetivo de indagar en la presencia de motivos cortos de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de NIS, se procedió a realizar un análisis *in silico* de la secuencia de la proteína mediante el software Eukaryotic Linear Motif (ELM) (260). Los resultados obtenidos indican la presencia de numerosos posibles motivos lineales de aminoácidos que podrían ser relevantes en la fisiología de la proteína. Un análisis detallado de los mismos permitió seleccionar solo aquellos relevantes para el proceso de transporte intracelular de NIS (Figura 7A). Entre los más relevantes, se destacan motivos de interacción con proteínas adaptadoras cadenas livianas de kinesinas, con adaptadores de clatrina, con dominios SH3 y con dominios PDZ.

En general, regiones importantes de las proteínas, ya sean dominios catalíticos o señales que regulan su fisiología y actividad, se encuentran altamente conservadas en organismos de distintas especies, que en muchos casos pueden ser distantes taxonómicamente. Con el fin de identificar zonas de alta conservación evolutiva, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de NIS de distintos mamíferos. Se utilizaron únicamente secuencias de mamíferos, dado que las secuencias carboxilo terminal de otros filos difieren notablemente con la secuencia de NIS humano, particularmente en su longitud, lo cual no permitiría tener una idea general de la conservación del carboxilo terminal de la proteína. Las zonas de mayor conservación se corresponden con la primera porción del carboxilo terminal, en particular la región comprendida entre los residuos I546 y E578, lo cual concuerda con la importancia de esta región en el transporte intracelular de NIS como se demostró previamente. Luego existen zonas de conservación variable, presentando alto grado de conservación en residuos puntuales que parecen ser parte de motivos cortos de aminoácidos, identificados previamente mediante el software ELM, y que podrían ser importantes en los procesos de transporte intracelular (Figura 7A). A fines de conocer la relevancia de cada uno de estos motivos cortos de aminoácidos en el transporte de NIS a la membrana plasmática, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Nancy Carrasco (Yale University, EE.UU.), se disrumpió cada uno de estos motivos reemplazando aminoácidos claves del motivo por residuos alaninas mediante mutagénesis sitio dirigida. En total se generaron nueve mutantes de NIS (W565A/D566A, V580A, I582A/L583A, L587A, V588A, L594A, K599A/K600A, L612A, T641X) alterando un total de nueve motivos cortos de aminoácidos (motivos triptofano ácido, PDZ interno, monoleucina, PDZ interno, SH3, PDZ interno, transporte retrógrado, PDZ interno y PDZ terminal, respectivamente) (Figura 7A). Cada una de las mutantes fue transfectada de forma estable en la línea celular MDCK-II.

Como se muestra en la Figura 7B-C, las únicas mutantes que alteraron el transporte de NIS a la membrana plasmática son aquellas en las cuales se disrumpió el motivo triptofano ácido (563-LWWD-566), el motivo basado en leucina (578-EEVAIL-583) o el motivo PDZ tipo 1 (641-TNL-643). Según lo evaluado mediante el ensayo de captación de yoduro, estas tres mutantes presentaron una disminución en la capacidad de transportar yoduro en comparación con la proteína WT. Además, ensayos de citometría de flujo demuestran que estas tres mutantes presentan una menor expresión en la membrana plasmática en comparación con la

proteína WT. Estos resultados permiten concluir que estos tres motivos aminoacídicos estarían involucrados de forma independiente en el transporte de NIS a la membrana plasmática. Sin embargo, vale destacar que únicamente la disrupción del motivo triptofano ácido parece generar una retención completa de la proteína en compartimentos intracelulares debido a que células que expresan dicha mutante no pueden acumular yoduro. La disrupción de los motivos basado en leucina y PDZ tipo 1 genera efectos parciales en la localización subcelular de NIS, dado que células que expresan estas formas mutantes de NIS presentan cierta capacidad de acumular yoduro.

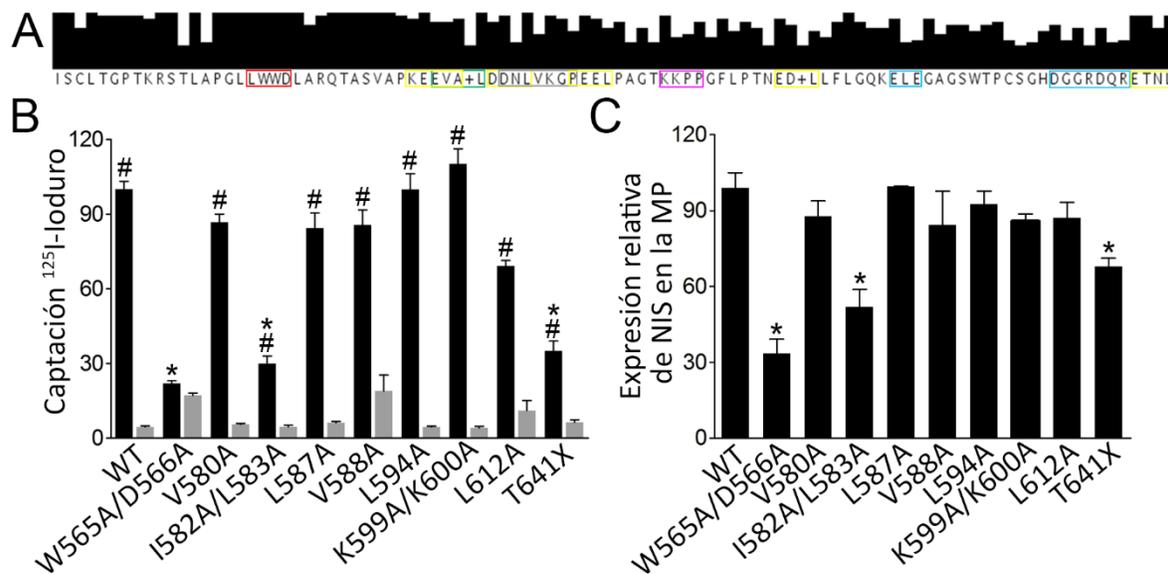


Figura 7. Relevancia de motivos cortos de aminoácidos del carboxilo terminal de NIS para su expresión en la membrana plasmática. **A.** Esquema de la secuencia carboxilo terminal de NIS. La altura de las barras en negro del histograma indica el grado de conservación de cada residuo en mamíferos. En recuadros de colores se indican los motivos cortos de aminoácidos identificados mediante el software ELM (Rojo: triptofano ácido, Verde: dileucina ácido, Amarillo: PDZ, Magenta: transporte retrógrado, Turquesa: cluster ácido, Gris: SH3). **B.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT NIS y las mutantes de NIS en las cuales se rompieron los motivos cortos de aminoácidos. Los resultados se expresan en pmol yoduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **C.** Cuantificación de la expresión relativa en la membrana plasmática de WT NIS y las mutantes de NIS en las cuales se rompieron los motivos cortos de aminoácidos analizada mediante citometría de flujo. *p <0.05 (ANOVA, Dunns post-test).

4.2 Identificación de nuevas mutaciones en el gen *slc5a5* asociadas al desarrollo de hipotiroidismo congénito

Con el objetivo de comprender las bases moleculares del cuadro de hipotiroidismo congénito detectado en tres pacientes pediátricos cuyo fenotipo clínico, bioquímico e imagenológico sugiere un defecto en el transporte de yoduro, se procedió al estudio de la secuencia que codifica el gen *slc5a5*.

4.2.1 Cuadro clínico y secuenciación del gen *slc5a5* en pacientes con hipotiroidismo congénito

Se estudiaron tres pacientes con hipotiroidismo congénito detectados a partir de la pesquisa neonatal de la enfermedad. El Paciente A fue diagnosticado con hipotiroidismo congénito por medio de la pesquisa neonatal de hipotiroidismo congénito (TSH 200 $\mu\text{UI/ml}$. Línea de corte $<15 \mu\text{IU/ml}$) en el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires). El diagnóstico de la enfermedad fue confirmado con el dosaje en suero de TSH 150 $\mu\text{UI/ml}$ (valores de referencia 1.3-10 $\mu\text{U/ml}$), T4 total 1.1 $\mu\text{g/dl}$ (valores de referencia 6.0-14.0 $\mu\text{g/dl}$) y T3 total 30 ng/dl (valores de referencia 80-240 ng/dl). El estudio ecográfico demostró una glándula tiroides de correcta ubicación y tamaño, mientras que la centellografía utilizando el trazador ^{131}I -ioduro reveló la ausencia de su acumulación en la glándula tiroides y glándulas salivales (Tabla 4). La secuenciación del gen *slc5a5* reveló una transición heterocigota G>A en la posición +991 (c.991G>A) localizada en el exón 8 y una transversión heterocigota C>A en la posición 1.641 (c.1.641C>A) localizada en el exón 13 que se traducen en un cambio de ácido aspártico por asparragina en la posición 331 (p.D331N) y un cambio de serina por arginina en la posición 547 (p.S547R), respectivamente (Tabla 5 y Figura 8A).

El Paciente B fue diagnosticado con hipotiroidismo congénito a partir de la pesquisa neonatal (TSH 64 $\mu\text{UI/ml}$, línea de corte $<10 \mu\text{IU/ml}$) en el Hospital de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba). El diagnóstico fue confirmado con el dosaje en suero de TSH 203 $\mu\text{UI/ml}$ (valores de referencia 0.44–8.80 $\mu\text{UI/ml}$), T4 libre 1.6 ng/dl (valores de referencia 0.9 –2.3 ng/dl), T4 total 8.7 $\mu\text{g/dl}$ (valores de referencia 7.2–15.6 $\mu\text{g/dl}$), T3 total 121 ng/dl (valores de referencia 105–245 ng/dl) y tiroglobulina 84 ng/ml (valores de referencia 6.44–82.82 ng/ml). La ecografía reveló una glándula tiroides de correcta ubicación y tamaño (2,3 ml). El ensayo de centellografía utilizando el trazador radioactivo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertenectato mostró una captación severamente reducida en la glándula tiroides (Tabla 4). La secuenciación del gen *slc5a5* reveló una transición homocigota G>A en la posición +1.682 localizada en el exón 14. A nivel proteico esta mutación se traduce en un cambio no sinónimo de glicina por ácido glutámico en la posición 561 (p.G561E) (Tabla 5 y Figura 9A).

El Paciente C fue diagnosticado con hipotiroidismo congénito a partir de la pesquisa neonatal de hipotiroidismo congénito (TSH 60 $\mu\text{UI/ml}$. Línea de corte $<15 \mu\text{IU/ml}$) en el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez (Buenos Aires). El diagnóstico de la enfermedad fue confirmado con la medición en suero de TSH 72 $\mu\text{UI/ml}$ (valores de referencia 1.3-10 $\mu\text{U/ml}$), T4 total 0,8 $\mu\text{g/dl}$ (valores de referencia 6.0-14.0 $\mu\text{g/dl}$) y T3 total 51 ng/dl (valores de referencia 80-240 ng/dl). El estudio ecográfico demostró una glándula tiroides de correcta ubicación y tamaño; mientras que la centellografía utilizando el trazador ^{131}I -ioduro reveló ausencia de acumulación en la glándula tiroides y glándulas salivales (Tabla 4). La secuenciación del gen *slc5a5* permitió identificar una transición heterocigota G>A en la posición +1.627 (c.1.627G>A) localizada en el exón 13 y una transversión heterocigota T>A en la posición 1.684 (c.1.684T>A) localizada en el exon 14 que se traducen en un cambio de glicina por arginina en la posición 543 (p.G543R) y un cambio de leucina por metionina en la posición 562 (p.L562M), respectivamente (Tabla 5 y Figura 10A).

Tabla 4. Evaluación bioquímica e imagenología de los pacientes en estudio.

	Paciente A	Paciente B	Paciente C
Pesquisa Neonatal			
TSH (μUI/ml)	>200 (línea de corte 15)	64 (línea de corte 10)	60 (línea de corte 15)
Confirmación diagnóstica			
TSH sérica (μUI/ml)	150	203	72
T ₄ libre (ng/dl)	-	1.6	-
T ₄ total (μg/dl)	1.1	8.7	0.8
T ₃ total (ng/dl)	30	121	51
Tiroglobulina (ng/ml)	-	84	-
Ultrasonido de Tiroides			
	Normal	Normal	Normal
	Correcta localización y tamaño	Correcta localización y tamaño	Correcta localización y tamaño
Centellografía ^{99m}Tc-pertecnectato / ¹³¹I-Ioduro			
Captación Tiroides	No detectado	Severamente reducida	No detectado
Captación Glándulas Salivales	No detectado	-	No detectado

Tabla 5. Resultados de secuenciación del gen *slc5a5* de los pacientes en estudio.

	Mutación	Genotipo	Localización	Proteína
Paciente A	Transición G>A	Heterocigota	c.991 – exón 8	D331N
	Transición C>A	compuesto	c.1.641 – exón 13	S547R
Paciente B	Transición G>A	Homocigota	c.1.682 – exón 14	G561E
Paciente C	Transición G>A	Heterocigota	c.1.627 – exón 13	G543R
	Transversión T>A	compuesto	c.1.684 – exón 14	L562M

4.2.2 Caracterización funcional de las mutantes de NIS identificadas

A continuación, con el fin de caracterizar el impacto patológico de las mutaciones halladas en los pacientes se procedió al estudio funcional de las mismas al igual que se realizó con las mutantes de NIS en las cuales se disrumpieron motivos cortos de aminoácidos.

4.2.2.1 Caracterización de las mutantes D331N y S547R NIS

Estudios de captación de yoduro en células HEK293T, que no expresan NIS endógeno, transfectadas de forma transiente para expresar las mutantes D331N o S547R NIS revelaron una escasa o indetectable acumulación de yoduro en comparación con células expresando WT NIS (Figura 8B). El patrón electroforético de WT NIS mostró polipéptidos no glicosilados (~55 kDa, banda B'), parcialmente glicosilados (~60 kDa, banda B) y completamente glicosilados (~90-100 kDa, banda A) (Figura 8C). Por otra parte, dichos ensayos de Western blot revelaron que el polipéptido de NIS completamente glicosilado o maduro que ya abandonó el complejo de Golgi y se localiza en la membrana plasmática o en la ruta hacia ella, es escasamente detectable en células que expresan D331N NIS, mientras que estuvo ausente en aquellas que expresan S547R NIS (Figura 8C). La mutante S547R presentó únicamente las bandas parcialmente glicosiladas (menores a 60 kDa), que se condicen con aquella proteína que aún se localiza en el RE. Los patrones electroforéticos observados sugieren que ambas mutantes exhiben una maduración parcial, siendo principalmente retenidas en el RE. En línea con estas observaciones, el análisis mediante microscopía confocal reveló que D331N y S547R NIS co-localizan principalmente con el marcador de RE anti-SEKDEL, indicando que estas mutantes son retenidas en el RE y, por lo tanto, no se localizan en la membrana plasmática (Figura 8D). Es interesante destacar que la alineación de múltiples secuencias ortólogas de NIS de diferentes especies de metazoos reveló que las variantes D331N y S547R afectan residuos altamente conservados (Figura 8E), lo que respalda su importancia en la biología de NIS.

4.2.2.2 Caracterización de la mutante de G561E NIS

Con el fin de entender la causalidad de la deficiencia en transporte de yoduro en el Paciente B, se procedió a la caracterización bioquímica de la mutante de G561E NIS.

Los estudios de captación de yoduro revelaron que las células MDCK-II que expresan establemente la mutante G561E NIS presentan una menor capacidad de acumular yoduro, en comparación con aquellas células que expresan establemente WT NIS (Figura 9B). Considerando que el cambio de la glicina en la posición 561 por un ácido glutámico podría ser disruptivo producto de la carga negativa del ácido glutámico, se evaluó la actividad de la mutante G561Q NIS donde se reemplazó la glicina por una glutamina, aminoácido que posee el mismo esqueleto carbonado del ácido glutámico, pero no presenta carga negativa. Sin embargo, la mutante G561Q NIS no recupera la actividad al nivel de la proteína WT (Figura 9B), demostrando que el reemplazo del aminoácido glicina en la posición 561 por aminoácidos de cadena carbonada larga y polares produce una disminución en la actividad de la proteína. Además, estos resultados revelan que la disminución de la capacidad de acumular yoduro de la mutante G561E no se debería a la carga negativa del ácido glutámico sino más bien a las propiedades estructurales de la cadena lateral del residuo.

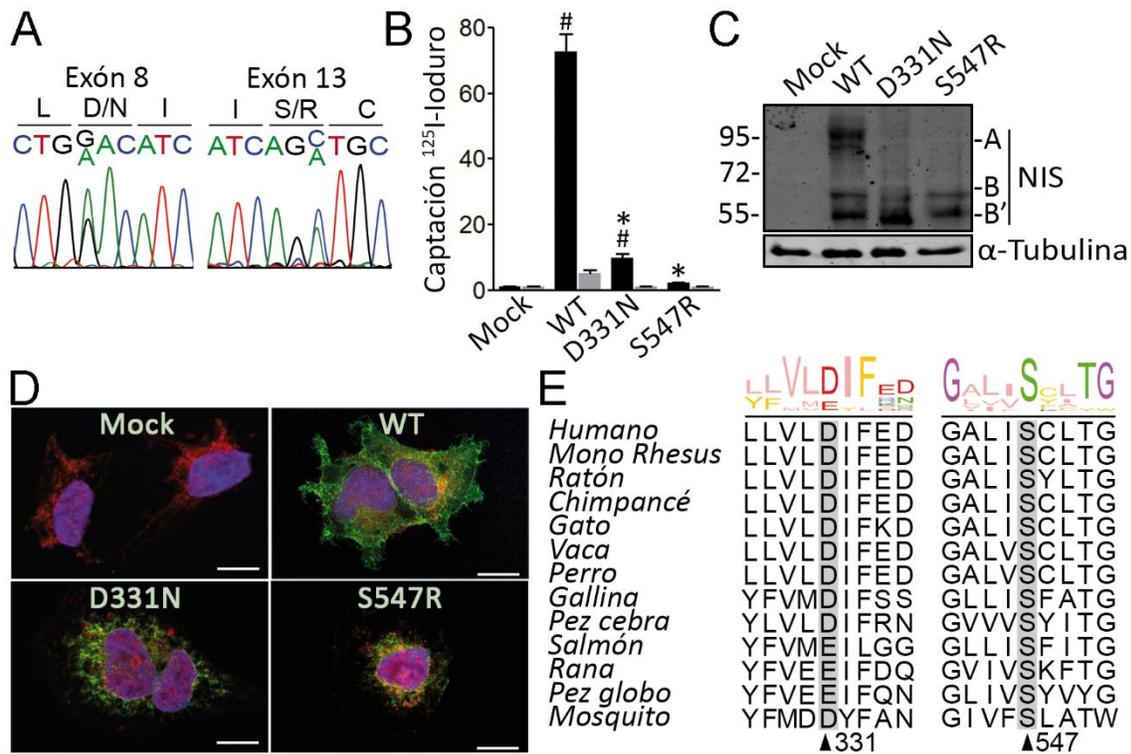


Figura 8. Caracterización funcional de las mutantes D331N y S547R NIS. **A.** Cromatograma mostrando fragmentos de los exónes 8 y 13 (nucleótidos +986 a +996 y +1.636 a +1.644, respectivamente) del gen *slc5a5*. Se indican las mutaciones heterocigotas compuestas c.991 G>A (p.D331N) y c.1.641 C>A (p.S547R) identificadas en el Paciente A. **B.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células HEK-293T expresando de forma transiente WT, D331N o S547R NIS. Los resultados se expresan en pmol ioduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **C.** Western blot analizando el patrón electroforético de WT, D331N o S547R NIS. (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado y (B') péptido no glicosilado. α-Tubulina control de carga. **D.** Microscopía confocal analizando la localización subcelular de WT, D331N o S547R en células HEK-293T permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-NIS (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm. **E.** Alineación de múltiples secuencias de aminoácidos alrededor de los residuos D331 y S547 de NIS humano de ortólogos de NIS de diferentes especies de metazoos generadas con PSI/TM-Coffee.

Por otra parte, al evaluar mediante citometría de flujo marcando HA-NIS en condiciones permeabilizadas y no permeabilizadas se observó que la mutante G561E se encuentra en menor proporción en membrana plasmática que la proteína WT (Figura 9C-D). Al analizar el patrón electroforético de la mutante G561E NIS y compararlo con el correspondiente a la proteína WT, se visualizó que la mutante G561E NIS presenta una menor proporción de la banda correspondiente a la proteína madura a expensas de un incremento de la forma inmadura de NIS (Figura 9E). Estos resultados sugieren que la mutante G561E NIS presenta un defecto en su maduración, llegando en menor medida al complejo de Golgi en comparación con la proteína WT, lo cual sugiere una anomalía en el transporte de RE a Golgi. Cuando se evaluó su localización mediante inmunofluorescencia confocal en tinciones realizadas en condiciones permeabilizantes, se observó que la mutante G561E co-localiza fuertemente con el marcador de RE anti-SEKDEL, y, en menor medida, presenta localización en la membrana plasmática (Figura 9F). A diferencia de esto, WT NIS se localiza principalmente en la membrana plasmática, presentando una escasa o nula co-localización con el marcador de RE.

Para descartar la posibilidad de que la mutación G561E afecte la funcionalidad intrínseca de la proteína, se realizaron experimentos de captación de yoduro en vesículas membranosas totales (excluyendo la membrana nuclear) generadas a partir de células MDCK-II expresando establemente WT y G561E NIS. El ensayo reveló que la mutación G561E no afecta la actividad intrínseca de la proteína de transportar yoduro (Figura 9G).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la mutante G561E NIS no puede madurar correctamente a lo largo de la vía exocítica, siendo parcialmente retenida en el RE, y por ende su expresión en la membrana plasmática y, consecuentemente, su capacidad de transportar yoduro se encuentran reducida. Vale destacar que la posición 561 se encuentra adyacente al conservado motivo triptofano ácido mencionado anteriormente (ver sección 4.1.3 y 4.3), lo cual podría tener relación con la alteración funcional de la proteína como base de la patología del paciente.

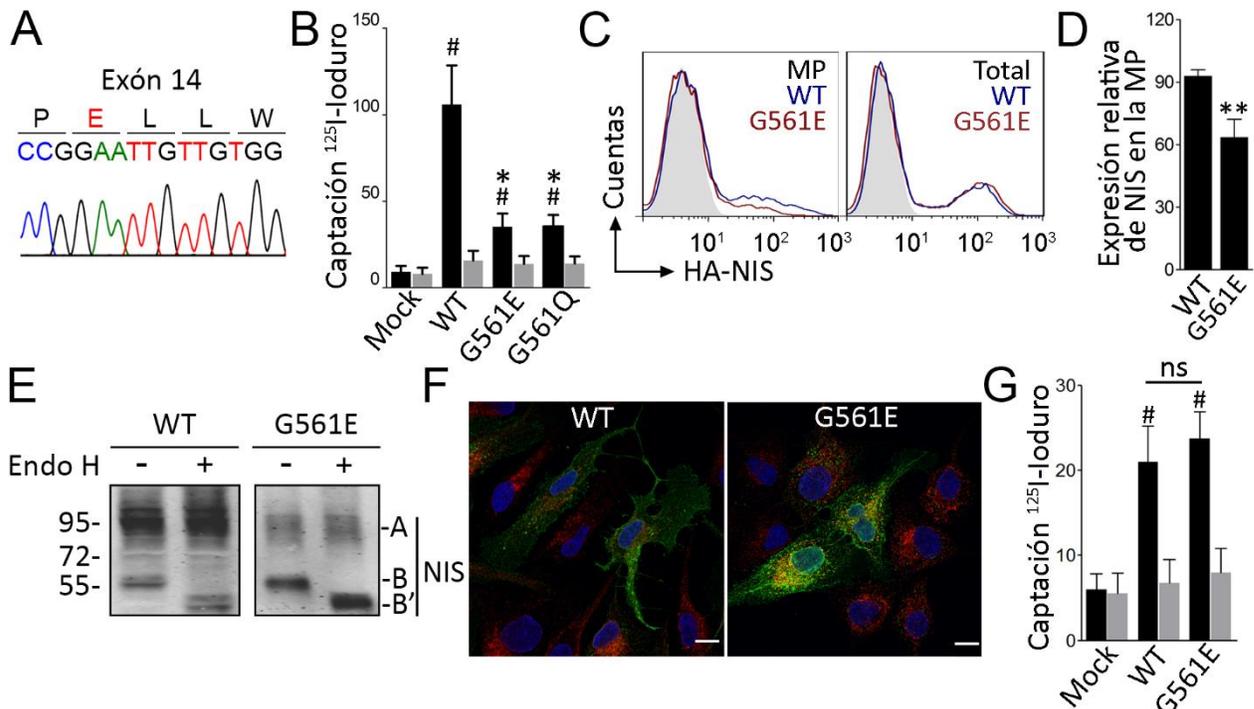


Figura 9. Caracterización funcional de la mutante G561E NIS. **A.** Cromatograma mostrando un fragmento del exón 14 (nucleótidos +1.678 a +1.686) del gen *slc5a5*. Se indica la mutación c.1.682 G>A (p.G561E) identificada en el Paciente B. **B.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT, G561E o G561Q NIS. Los resultados se expresan en pmol yoduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **C.** Citometría de flujo analizando la expresión de WT o G561E NIS en células MDCK-II no permeabilizadas (MP) y permeabilizadas (total). **D.** Cuantificación de la expresión relativa de WT o G561E NIS en la membrana plasmática analizada mediante citometría de flujo. **p<0.01 (Mann-Whitney t-test). **E.** Western blot analizando cambios en el patrón electroforético de WT NIS o G561E luego del tratamiento con Endo H. (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado, (B') péptido sin glicosilaciones. **F.** Microscopía confocal analizando la localización subcelular de WT o G561E NIS en células MDCK-II permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-NIS (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm. **G.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en vesículas de membrana preparadas de células MDCK-II expresando WT y G561E NIS. Los resultados se expresan en pmol yoduro/mg protein ± SD. ns: sin significancia estadística (ANOVA, Newman-Keuls test).

4.2.2.3 Caracterización de las mutantes de G543R y L562M NIS

Con el fin de entender la causalidad de la deficiencia en transporte de yoduro en el Paciente C, se procedió a la caracterización de las mutantes G543R y L562M NIS, al igual que se realizó con la mutante G561E identificada en el Paciente B.

Mutaciones en la posición 543 ya han sido descritas en pacientes con ITD. De la Vieja *et al.* (60) caracterizaron la mutante G543E NIS hallada en un paciente con ITD, concluyendo que dicha mutación produce un problema en el plegamiento proteico que impide la correcta maduración de la proteína y su consecuente retención en RE. En este trabajo, los autores evaluaron también los efectos de la sustitución de la glicina de la posición 543 por otros aminoácidos cargados: ácido glutámico, lisina y arginina. Cualquiera de estas sustituciones produce un efecto similar al observado en la mutante G543E NIS, es decir, la retención intracelular de la proteína en el RE. Los estudios de captación de yoduro revelaron que las células que expresan de forma estable la mutante G543R NIS no acumulan yoduro, en comparación con aquellas células que expresan WT NIS (Figura 10B). Al evaluar mediante citometría de flujo, marcando HA-NIS en condiciones permeabilizadas y no permeabilizadas, tanto para la mutante como para WT, se observó que la mutante G543R NIS se encuentra en menor proporción en membrana plasmática que la proteína WT (Figura 10C). En cuanto al patrón electroforético de la mutante G543R NIS, se comprobó que dicha mutante únicamente presenta el polipéptido parcialmente glicosilado, a diferencia de WT NIS que presenta el polipéptido maduro y el parcialmente glicosilado (Figura 10D). Al evaluar la localización subcelular de la mutante G543R NIS mediante microscopía confocal se observó que dicha mutante es retenida intracelularmente y co-localiza con el marcador de RE anti-SEKDEL (Figura 10E). Estos resultados demuestran que la mutante G543R es retenida intracelularmente en el RE, y disminuyéndose así su expresión en membrana plasmática y consecuentemente su capacidad de transportar yoduro.

Por otra parte, la mutación L562M se encuentra adyacente a la mutación G561E identificada en el Paciente B, y por ende adyacente también al motivo triptofano ácido mencionado anteriormente. Con el objetivo de evaluar el impacto de la mutante L562M en la fisiología de NIS, se generaron células MDCK-II expresando establemente la mutante L562M NIS.

Los estudios de captación de yoduro revelaron que las células que expresan L562M presentaron una disminución en su capacidad de acumular yoduro, en comparación con aquellas células que expresan WT NIS (Figura 10B). Al evaluar mediante citometría de flujo, en condiciones permeabilizadas y no permeabilizadas, se observó que la mutante L562M NIS se encuentra en menor proporción en membrana plasmática que la proteína WT (Figura 10C), lo cual explica la disminución en la captación de yoduro.

Al analizar el patrón electroforético de la mutante L562M NIS, se observó una menor proporción de la banda correspondiente a la proteína madura en comparación con la banda correspondiente a la proteína WT (Figura 10D). Esto indica que la mutante L562M presenta un defecto en su maduración, llegando en menor medida al complejo de Golgi en comparación con la proteína WT, lo cual sugiere problemas en el transporte de RE a Golgi. En concordancia, al evaluar su localización en tinciones realizadas en condiciones permeabilizadas, se encontró que la mutante L562M co-localiza fuertemente con el marcador de RE anti-SEKDEL, y, en menor medida, presentó localización en membrana plasmática (Figura 10E).

En conclusión, los resultados sugieren que la mutante L562M NIS presenta un comportamiento similar al observado para la mutante G561E NIS y por lo tanto, ambas presentan un defecto en su proceso de maduración a lo largo de la vía exocítica o hacia la membrana plasmática, que conlleva a la retención parcial de las mutantes en el RE.

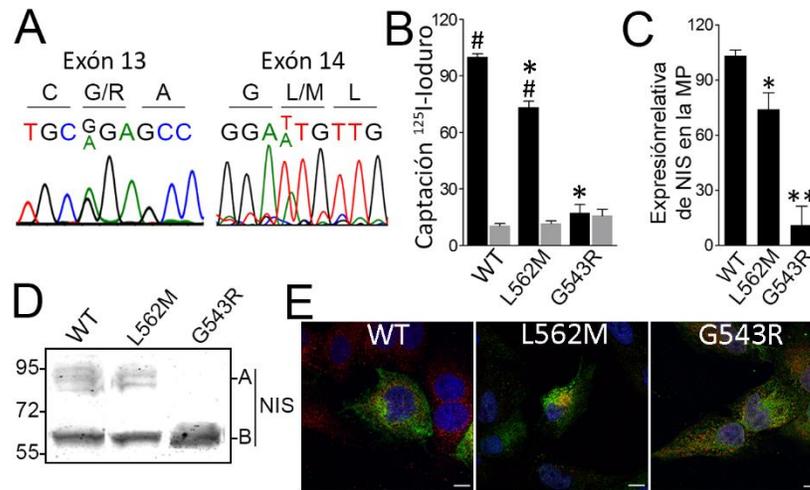


Figura 10. Caracterización funcional de las mutantes G543R y L562M NIS. **A.** Cromatograma mostrando fragmentos de los exones 13 y 14 (nucleótidos +1.624 a 1.632 y +1.681 a +1.689, respectivamente) del gen *slc5a5*. Se indican las mutaciones en heterocigosis compuesta c.1.627 G>A (p.G543R) y c.1.684 T>A (p.L562M) identificadas en el Paciente C. **B.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT NIS o las mutantes L562M y G543R NIS. Los resultados se expresan en pmol ioduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **C.** Cuantificación de la expresión relativa de WT NIS y las mutantes L562M y G543R NIS en la membrana plasmática analizada mediante citometría de flujo. *p<0.05, **p<0.01 (ANOVA, Dunns post-test). **D.** Western blot analizando el patrón electroforético de WT, L562M y G543R NIS. (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado. **E.** Microscopía confocal analizando la expresión de WT, L562M y G543R NIS en células MDCK permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-NIS (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm.

4.3 Relevancia del motivo triptofano ácido (563-LWWD-566) del carboxilo terminal en la salida de NIS del RE asistida por KLC2

Como se mostró en la sección 4.1.3, el motivo triptofano ácido localizado en el carboxilo terminal de NIS (563-LWWD-566) es importante para su transporte a la membrana plasmática. Las mutaciones G561E y L562M se encuentran aledañas al motivo triptofano ácido del carboxilo terminal de NIS, lo cual nos llevó a preguntarnos si de alguna manera estas mutaciones alteraban la funcionalidad de dicho motivo. Significativamente, este motivo se halla altamente conservado desde peces hasta mamíferos (Figura 11A), lo cual sugiere una gran relevancia fisiológica del mismo para la proteína. Los motivos triptofano ácidos son reconocidos por proteínas cadena liviana de kinesina (KLC), involucradas en los procesos de transporte intracelular (209).

4.3.1 La interrupción del motivo triptofano ácido genera la retención de NIS en el RE

Como se mencionó anteriormente, la interrupción del motivo triptofano ácido (W565A/D566A NIS) conlleva a una disminución en la capacidad de acumular yoduro de las células que expresan la mutante (Figura 11B) debido a una disminución de la expresión de NIS en la membrana plasmática como se evidenció mediante citometría de flujo (Figura 11C). Estos resultados indican que la ausencia del motivo triptofano ácido conduce a la retención intracelular de la proteína. Con el objetivo de identificar la naturaleza de estos compartimentos intracelulares, se analizó el patrón de glicosilación y la localización subcelular de esta mutante. Cuando se analizó el patrón de bandas de la mutante W565A/D566A NIS, se observó únicamente la presencia de la banda correspondiente a la forma inmadura o parcialmente glicosilada de la proteína, es decir aquella que se encuentra en RE (Figura 11D). Por otra parte, al analizar la localización subcelular de esta mutante mediante microscopía confocal se observó que co-localiza principalmente con el marcador de RE (anti-SEKDEL) (Figura 11E). Estos resultados se encuentran en concordancia con la ausencia de acumulación de yoduro de aquellas células transfectadas con la mutante W565A/D566A NIS y con la disminución de su expresión en la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que la interrupción del motivo triptofano ácido produce la retención de NIS en el RE, es decir que este motivo de aminoácidos es importante para la salida de la proteína del RE y su posterior transporte al complejo de Golgi.

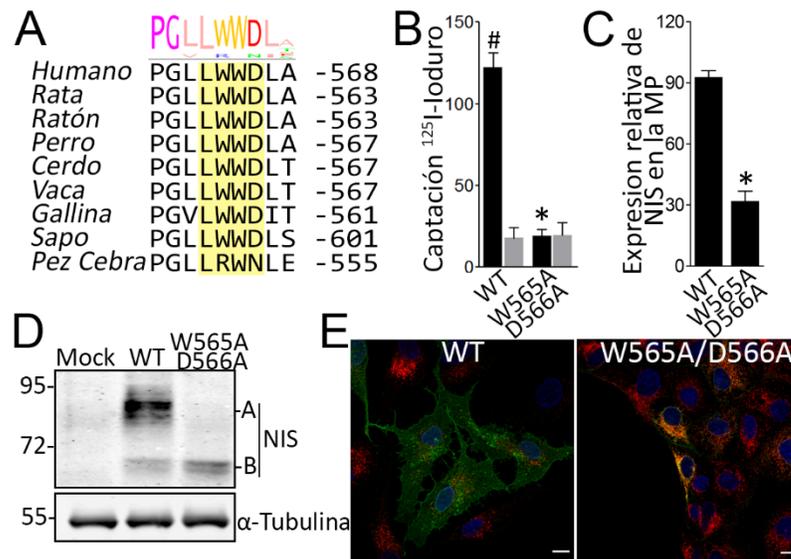


Figura 11. El motivo triptofano ácido es clave para la salida de NIS del ER. **A.** Alineamiento múltiple de secuencias de NIS demostrando el alto grado de conservación del motivo triptofano ácido LxWD en ortólogos de diferentes especies de metazoos. **B.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT y W565A/D566A NIS. Los resultados se expresan en pmol yoduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **C.** Cuantificación de la expresión relativa de WT NIS y W565A/D566A NIS en la membrana plasmática analizada mediante citometría de flujo. *p<0.05 (Mann-Whitney t-test). **D.** Western blot analizando el patrón electroforético de WT y W565A/D566A NIS. (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado. α-Tubulina control de carga. **E.** Microscopía confocal analizando la expresión de WT y W565A/D566A NIS en células MDCK-II permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-NIS (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm.

4.3.2 El motivo triptofano ácido del carboxilo terminal de NIS es reconocido por la proteína KLC2

Con el fin de indagar en la posible interacción entre el motivo triptófano ácido de NIS y alguna isoforma de KLC, se evaluó en primer lugar la expresión de dichas isoformas en el tejido tiroideo. Según el Atlas de Proteínas Humanas (212), la isoforma KLC2 presenta mayor expresión en la glándula tiroidea, lo cual nos llevó a pensar que KLC2 sería la proteína que reconoce el motivo triptofano ácido y asiste la salida de NIS del RE. Es por esto que se examinó la posible interacción entre el carboxilo terminal de NIS y la proteína KLC2.

Al analizar los eluatos resultantes de una precipitación mediante GFP-Trap de la proteína KLC2 en lisados de células HEK293T co-transfectadas transientemente con NIS y GFP-KLC2, se observó la presencia de dos polipéptidos de NIS. Uno que se correspondería con la forma inmadura o parcialmente glicosilada de NIS, y otro de ~120 kDa que se correspondería con una forma dimérica de la forma parcialmente glicosilada de NIS (Figura 12A). No se observaron bandas que se correspondan con la forma madura de la proteína. Cuando se realizó el mismo experimento en un lisado proveniente de células co-transfectadas con la mutante W565A/D566A NIS y GFP-KLC2, se observó un patrón electroforético similar de menor intensidad. Esto indica una disminución de la interacción proteica debida a la interrupción del motivo triptófano ácido, sugiriendo que NIS interactúa con KLC2 por medio del motivo triptofano ácido.

Con el fin de verificar la existencia de la interacción entre NIS y KLC2 dependiente del motivo triptofano ácido, se realizó un ensayo de ligación por proximidad (PLA) en células HEK293T co-transfectadas con un plásmido de expresión de WT NIS o la mutante W565A/D566A NIS y GFP-KLC2. La técnica de PLA es una técnica de inmunofluorescencia que permite visualizar como puntos fluorescentes la interacción entre dos proteínas basándose en el principio de ligación por proximidad de hebras de ADN conjugadas a anticuerpos (270). Para que se pueda concretar la ligación de las hebras de ADN las proteínas en estudio deben estar a una distancia menor a 10 nm. En aquellas células co-transfectadas con la proteína WT NIS y GFP-KLC2, se observó la presencia de señal fluorescente que demuestra la interacción entre ambas proteínas. Por el contrario, en células co-transfectadas con W565A/D566A NIS y GFP-KLC2, se observó una disminución de la señal fluorescente respecto a WT NIS, sugiriendo una disminución de la interacción entre ambas proteínas (Figura 12B).

Con el objetivo de indagar la relevancia de KLC2 en la fisiología tiroidea, evaluamos la acumulación de yoduro de células PCCL3 y FRTL5 donde la expresión de KLC2 fue reprimida mediante shARN (shKLC2). Se generaron líneas celulares monoclonales estables provenientes de células PCCL3 y FRTL5, expresando los shARN control (shSCR) o para silenciar KLC2. Mediante esta técnica se pudo obtener niveles de silenciamiento de KLC2 entre 60 y 90% con respecto a la línea celular control transfectada con un shSCR (Figura 12C y E). Al evaluar la capacidad de acumular yoduro de las líneas celulares silenciadas para KLC2, se observó que tanto la línea PCCL3 como FRTL5, presentan una severa reducción en la capacidad de acumular yoduro con respecto a las líneas control (Figura 12D-F). Estos resultados evidencian la importancia de KLC2 en el proceso de acumulación de yoduro y por ende en la fisiología tiroidea.

Además, al analizar el patrón electroforético de NIS en lisados provenientes de la línea celular PCCL3 en donde se silenció KLC2, se observó un aumento en la forma inmadura de la proteína (Figura 12C). Estos resultados

sugieren que en ausencia de KLC2, NIS se acumularía en el RE de estas células. Es importante destacar que mediante los experimentos realizados durante este trabajo de investigación no se puede descartar la posibilidad de que NIS interactúe con otras isoformas de KLC (en particular con KLC1 que también presenta expresión ubicua), como tampoco la posibilidad de que las proteínas KLC estén involucradas en distintas etapas del transporte de NIS a la membrana plasmática y no únicamente en la salida de NIS desde el RE hacia el Golgi.

A fines de investigar a nivel-atómico molecular la interacción entre el carboxilo terminal de NIS y la proteína KLC2, en colaboración con el laboratorio del Dr. Marcelo Martí (Universidad de Buenos Aires, Argentina), se procedió a realizar un modelado *in silico* del complejo proteico formado por un octapéptido de NIS humano que abarca el motivo triptofano ácido (P560-L567) y los dominios TPR de KLC2. El modelado sugiere que el motivo triptofano ácido de NIS interactúa con un bolsillo de la proteína KLC2 que posee parches hidrófobos (constituido principalmente por los residuos L248, R251, L263, N287, L290, L291), que interactúan con el residuo W565 de NIS, y parches básicos (constituido principalmente por los residuos R312, K325 y N329), que interactúan con el residuo D566 de hNIS (Figura 12G). Vale destacar que en el modelado molecular se aprecia que el péptido del carboxilo terminal de NIS debe encontrarse desestructurado o extendido para ser reconocido por KLC2.

Tomados en su conjunto estos resultados evidencian que KLC2 interactúa con NIS mediante el reconocimiento del motivo triptofano ácido, asistiendo su salida del RE y por ende regulando su expresión en la membrana plasmática. Cuando el motivo triptofano ácido se altera o se pierde o cuando disminuye o se pierde la expresión de KLC2, NIS pierde la capacidad de ser reconocido por KLC2 y por lo tanto queda retenido en el RE, disminuyendo así su expresión en la membrana plasmática, y consecuentemente reduciendo la capacidad de la célula de acumular yoduro.

4.3.3 TSH regula la expresión de KLC2

Según los resultados obtenidos, KLC2 es la proteína que asiste la salida de NIS del RE con dirección al complejo de Golgi a través del reconocimiento del motivo triptofano ácido localizado en su carboxilo terminal. Considerando la participación de KLC2 en la biología de NIS se estudió su localización subcelular. Se transfectaron de forma transiente células MDCK-II con un plásmido de expresión de la proteína de fusión GFP-KLC2. Con el objeto de analizar la co-localización de KLC2 con el RE se procedió a realizar una inmunofluorescencia en estas células marcando el RE con anti-SEKDEL. Al analizar mediante microscopía confocal, se observó que KLC2 presenta una localización citoplasmática, expandiéndose desde el RE hacia la membrana plasmática celular (Figura 12H). Una fracción de la proteína KLC2 se localiza en la región distal del RE, posiblemente en los ERES, presentando co-localización con el marcador anti-SEKDEL en estas regiones (Figura 12H, ampliación en esquina superior izquierda). Además, los resultados indican que KLC2 podría encontrarse involucrada en el transporte de proteínas a lo largo de toda la vía exocítica y no únicamente entre RE y Golgi, dado que KLC2 se localiza hasta regiones proximales a la membrana plasmática celular. Reportes previos han demostrado la relevancia de las kinesinas a lo largo de toda la vía exocítica y particularmente de la importancia la kinesina-1 en los procesos de transporte bidireccional entre RE y Golgi (215). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que KLC2 participa en el transporte de NIS desde el RE hacia el complejo de Golgi.

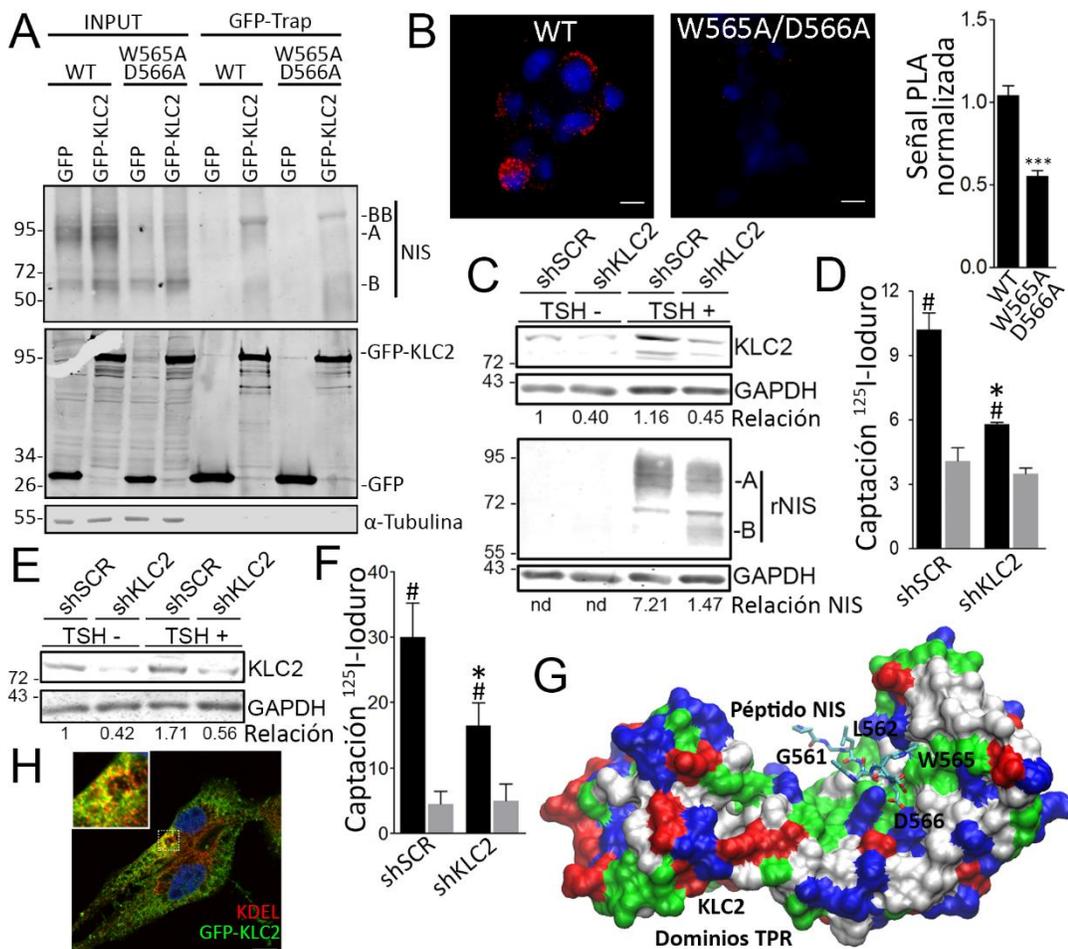


Figura 12. La proteína KLC2 interacta con el motivo triptofano ácido mediante la salida de NIS desde el RE hacia el complejo de Golgi. **A.** Ensayo de Western blot analizando el material inmunoprecipitado mediante GFP-Trap en células HEK-293T co-transfectadas de forma transiente con WT o W565A/D566A NIS y GFP o GFP-KLC2. El control de carga (INPUT) y los eluatos se evaluaron con anticuerpos anti-NIS, anti-GFP y anti- α -Tubulina (control de purificación). (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado, (BB) dímero de péptido parcialmente glicosilado. **B.** Ensayo de ligación por proximidad (PLA) en células HEK-293T co-transfectadas con WT o W565A/D566A NIS y GFP-KLC2. La señal de PLA normalizada se calculó analizando la señal fluorescente roja proveniente de células que expresan GFP-KLC2 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm . *** $p < 0.0001$ (Student's t-test) **C.** Ensayo de Western blot evaluando la expresión de KLC2 y NIS en células PCCL3 expresando establemente un shRNA control (shSCR) o específico para KLC2 (shKLC2). (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado. La expresión de GAPDH se indica como control de carga. **D.** Captación de ^{125}I -ioduro en células PCCL3 expresando establemente un shRNA control (Scr) o uno específico para KLC2 (shKLC2). Los resultados se expresan en pmol ioduro/ μg ADN. # $p < 0.05$ respecto a inhibición con perclorato. * $p < 0.05$ respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **E.** Ensayo de Western blot evaluando la expresión de KLC2 en células FRTL5 expresando establemente shSCR o shKLC2. GAPDH control de carga. **F.** Captación de ^{125}I -ioduro en células FRTL5 expresando establemente shScr o shKLC2. Los resultados se expresan en pmol ioduro/ μg ADN. # $p < 0.05$ respecto a inhibición con perclorato. * $p < 0.05$ respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **G.** Modelo atómico-molecular de la interacción de los dominios tetratricopéptidos (TPR) de KLC2 (PDB ID: 3ZFW) y el motivo triptofano ácido de NIS (octapéptido P560-L567). Los residuos de KLC2 fueron coloreados según sus características físicoquímicas (Rojo: ácido, Azul: básico, Blanco: hidrofóbico/apolar, Verde: polar/hidrofílico). **H.** Microscopía confocal analizando la expresión de GFP-KLC2 en células MDCK-II permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-GFP (verde) y anti-SEKDEL (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm .

Teniendo en cuenta que TSH es el principal regulador hormonal de la célula folicular tiroidea, se estudió su participación en la regulación de la expresión de KLC2. Para ello se realizó un ensayo de deprivación hormonal en células PCCL3 y FRTL5, en donde las células fueron crecidas en medio de cultivo sin TSH por 72 hs, siendo luego suplementadas con TSH en el medio de cultivo por 24 y 48 hs. Al comparar el patrón electroforético de KLC2 de células deprivadas de TSH y células estimuladas con TSH, se observó un incremento significativo de su expresión en presencia de TSH (Figura 12C y E). Estudios previos han demostrado que TSH estimula la maquinaria de la vía secretoria para responder a la carga proteica a sintetizar y transportar (271). Nuestros resultados se encuentran en línea con lo descrito y además explicarían, al menos parcialmente, el mecanismo por el cual TSH regula de forma post-transcripcional la expresión de NIS en la membrana plasmática.

4.3.4 Importancia de la proteína KLC2 en la biosíntesis de hormonas tiroideas en pez cebra (*Danio rerio*)

Para corroborar los resultados obtenidos en un modelo *in vivo* evaluamos la relevancia de KLC2 en la fisiología tiroidea en embriones de pez cebra (*Danio rerio*), en colaboración con el laboratorio de la Dra. Nora Calcaterra (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Argentina). Los embriones de pez cebra fueron microinyectados con morfolinós de silenciamiento de KLC2 (MO-KLC2) o morfolinós control (MO-GLO) inmediatamente después de la fecundación (0 hora post fecundación (hpf)). El MO-KLC2 es un morfolino que bloquea el empalme que excluye al intrón 2 del ARN mensajero maduro que codifica para la proteína KLC2 (272). En caso de que este morfolino y su posterior microinyección funcionen adecuadamente, se esperaría que el intrón 2 del gen que codifica para KLC2 no sea excluido durante el proceso de corte y empalme y, por ende, forme parte del ARN mensajero maduro (Figura 13A). Cuando este ARN mensajero aberrante es traducido da lugar a una proteína trunca de 86 aminoácidos debido a la aparición de un codón de terminación prematuro que se encuentra en el intrón 2. La incorporación del intrón 2 al ARN mensajero maduro fue analizada mediante RT-PCR, con primers que hibridan en los exones 1 y 3 del gen que codifica KLC2, a las 48 y 120 hpf. Se observó la presencia de un producto de 425 pb para aquellos embriones microinyectados con el MO-GLO y un producto mayoritario de 617 pb para aquellos embriones microinyectados con MO-KLC2 (Figura 13B), lo cual evidencia que el empalme del intrón 2 fue bloqueado exitosamente mediante el morfolino utilizado. Si bien en lisados de peces microinyectados con MO-KLC2, el producto mayoritario es el de 617 pb, existe también un producto minoritario de 425 pb al igual que en los embriones control, lo cual indica que el silenciamiento de KLC2 en los peces microinyectados no es total. A las 48 hpf el bloqueo del empalme del intrón 2 es del 70% mientras que a las 120 hpf es del 60%. Si bien con el pasar de las hpf el efecto del morfolino decae, el grado de bloqueo del empalme del intrón 2 sigue siendo mayor al 50% incluso a 5 días de la microinyección.

Ante la incapacidad técnica de evaluar la captación de yoduro o la expresión proteica de NIS en larvas de pez cebra, se evaluó la funcionalidad tiroidea midiendo la cantidad de la hormona T4 sintetizada que aún se encuentra unida al esqueleto polipeptídico de tiroglobulina (T4-tiroglobulina) y se encuentra acumulada en el coloide de los folículos tiroideos (8). Mediante inmunofluorescencia realizada en larvas enteras, se observó una disminución significativa de la cantidad de T4-tiroglobulina en aquellas larvas que poseen KLC2 silenciado (MO-KLC2) en comparación con las larvas control (MO-GLO) (Figura 13C y E). Como control, utilizando la misma aproximación experimental, se analizó la cantidad de tiroglobulina en el coloide folicular evidenciando que el

silenciamiento de KLC2 no afecta los niveles de la proteína respecto de larvas control (Figura 13D y E). Adicionalmente, considerando la posibilidad que el silenciamiento de KLC2 afecte la morfogénesis de los folículos tiroideos, evaluamos el número y tamaño de folículos en las larvas control y silenciadas para KLC2 cuyos folículos fueron teñidos para analizar la expresión de tiroglobulina sin observar diferencias significativas. En conclusión, los resultados sugieren que el silenciamiento de KLC2 generaría un cuadro de hipotiroidismo dishormonogénico evidenciado por una disminución en la síntesis de T4 (sin efectos sobre la morfogénesis de las estructuras foliculares), producto de una disminución en la acumulación de yoduro como consecuencia de una reducción en la expresión de NIS en la membrana plasmática de la célula folicular tiroidea.

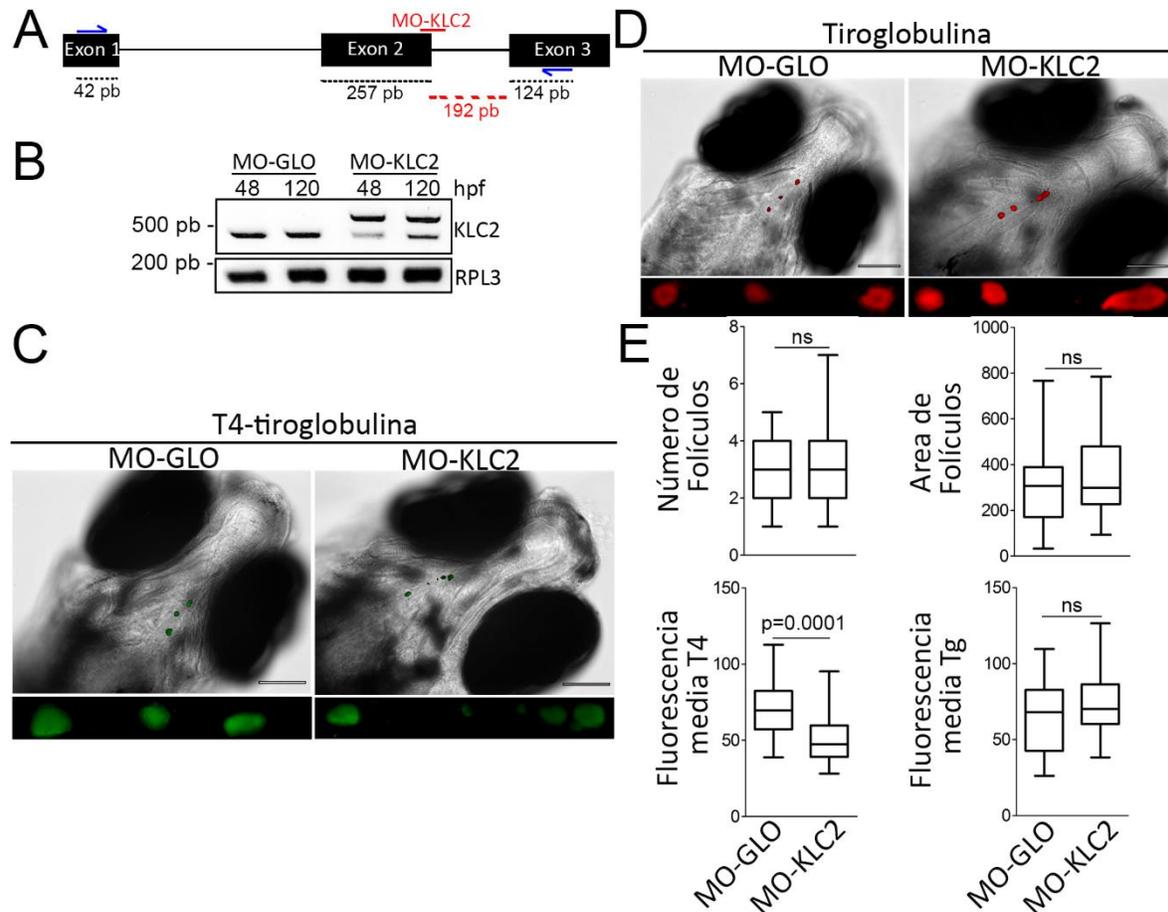


Figura 13. El silenciamiento de KLC2 en pez cebra disminuye la producción de Tiroxina (T₄). **A.** Modelo de acción del morpholino anti KLC2 (MO-KLC2) utilizado. En azul se muestran los oligonucleotidos utilizados en la reacción de PCR realizada para verificar el efecto de MO-KLC2 sobre el empalme de los exones 2 y 3 de KLC2. **B.** Producto de amplificación de la región del gen de KLC2 afectada por MO-KLC2. La retención del intrón 2 se verificó en larvas de 48 y 120 hpf. A modo de control de carga se utilizó el gen RPL3. **C y D.** Microscopía de epifluorescencia analizando los niveles de T4-Tiroglobulina (C) y Tiroglobulina (D) en el coloide de folículos tiroideos en larvas enteras de pez cebra tratadas con el morpholino control (MO-GLO) o MO-KLC2. **E.** Cuantificación de características de los folículos tiroideos en larvas de pez cebra tratadas con el morpholino control o MO-KLC2. Panel superior izquierdo: número de folículos. Panel superior derecho: superficie de los folículos. Panel inferior izquierdo: intensidad de fluorescencia media de T4-Tiroglobulina. Panel inferior derecho: intensidad de fluorescencia media de Tiroglobulina. ns: no significativo (Student's t-test).

4.3.5 Las mutaciones G561E y L562M alteran el reconocimiento del motivo triptofano ácido por KLC2

Como se mencionó anteriormente, las mutaciones G561E y L562M identificadas en sendos pacientes con hipotiroidismo congénito se encuentran adyacentes al motivo triptofano ácido identificado en el carboxilo terminal de NIS. Habiendo caracterizado la importancia del reconocimiento de dicho motivo por el adaptador KLC2, nos propusimos evaluar el efecto de las mutantes sobre la interacción entre NIS y KLC2.

4.3.5.1 La mutante G561E reduce la interacción entre NIS y KLC2 al estructurar el motivo triptofano ácido

Se evaluó la interacción entre la proteína mutante G561E NIS y KLC2 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando la tecnología GFP-Trap. El ensayo de co-inmunoprecipitación fue realizado en lisados provenientes de células MDCK-II expresando establemente WT o G561E NIS transfectadas transientemente con vectores de expresión para GFP o GFP-KLC2. Tal como se observó previamente (sección 4.3.2), la evaluación del patrón electroforético de NIS en los eluatos provenientes de células co-transfectadas con WT NIS y GFP-KLC2 reveló la presencia de dos bandas de ~60 kDa y ~120 kDa, que se corresponderían con polipéptidos monoméricos y diméricos de NIS parcialmente glicosilado (Figura 14A). En severo contraste, al realizar el mismo ensayo pero en presencia de la mutante G561E NIS no se observó la presencia de banda que revele la interacción de la mutante con KLC2. Complementariamente, se realizaron ensayos de ligación por proximidad (PLA) para corroborar el efecto de la mutación G561E sobre la interacción NIS:KLC2. En células HEK293T co-transfectadas con la mutante G561E NIS y GFP-KLC2, se observó una disminución en la cantidad de señal fluorescente en comparación células co-transfectadas con WT NIS y GFP-KLC2, lo cual indica una disminución de la interacción entre ambas proteínas (Figura 14B). Estos resultados revelan que la mutación G561E altera la interacción de NIS con KLC2 y consecuentemente la maduración de NIS a lo largo de la vía exocítica.

A fines de entender a nivel atómico-molecular el mecanismo que promueve la ruptura de la interacción entre la mutante G561E NIS y el adaptador KLC2 se modeló *in silico* el octapéptido P560-L567 de NIS humano conteniendo la mutante G561E dentro de la cavidad de reconocimiento del motivo triptofano ácido en la estructura de KLC2. La inspección visual de las trayectorias de los péptidos WT y E561 no reveló diferencias significativas en su interacción con KLC2. Este resultado no es sorprendente, ya que el residuo 561 no conforma el motivo de unión y no interaccionaría con KLC2 ya que su cadena lateral permanece expuesta al solvente durante la simulación, y en consecuencia, no generaría un impedimento estérico en el reconocimiento del motivo triptofano ácido por el adaptador KLC2. Es de destacar que los motivos triptofano ácido son reconocidos en contextos peptídicos desestructurados (209); por lo tanto, analizamos el efecto de la mutante G561E en la estructura intrínseca del motivo triptófono-ácido. Predicciones de la estructura secundaria de la región 552-565 de WT NIS y modelados por homología utilizando como templado el transportador de Benzilhidantoína Mhp1 (PDB ID: 2JLN) revelaron la posibilidad de conformación de una corta hélice precedida por el par PG que se encuentra altamente conservado (Figura 11A y Figura 14C). Se espera que este motivo PG rompa la hélice favoreciendo una conformación no estructurada requerida para su reconocimiento por el adaptador KLC2. Para poner a prueba esta hipótesis realizamos dinámicas moleculares de péptidos WT y G561E partiendo

de una conformación helicoidal completa. Durante la escala de tiempo de la simulación, el péptido que contiene G561E adopta una estructura secundaria helicoidal el 49% del tiempo en contraste con el 20% del péptido salvaje (Figura 14D). Además, la dinámica reveló una interacción de enlace de hidrógeno entre E561 y W564 en el péptido mutante que contribuiría a la estabilidad de las conformaciones alfa-helicoidales que enmascararía el motivo dificultando su reconocimiento por KLC2 (Figura 14E). Sobre la base de las predicciones bioinformáticas, planteamos la hipótesis de que G561E cambia el equilibrio del motivo triptofano ácido de unión a KLC2 naturalmente no estructurado hacia una conformación más estructurada que no permite su reconocimiento por el adaptador, resultando en la retención de la mutante en el retículo endoplásmico. Esto conllevaría a un defectivo transporte de la proteína mutante a lo largo de la vía exocítica, disminuyendo así la expresión de NIS en la membrana plasmática y por ende su capacidad de transportar yoduro, lo cual conllevaría a un cuadro de hipotiroidismo congénito como ocurre con el Paciente B.

4.3.5.2 La mutante de L562M NIS estabiliza la interacción entre NIS y KLC2

A fines de entender a nivel atómico-molecular el efecto de la mutante L562M en la interacción de NIS con la proteína KLC2, se procedió a estudiar el modelado molecular del complejo octapéptido NIS (P560-L567), conteniendo la mutación L562M, y KLC2. Al igual que la mutante G561E NIS, la mutante L562M NIS no altera directamente el motivo triptofano ácido de NIS dado que la posición en la cual se encuentra la mutación no constituye el centro de la interacción entre NIS y KLC2. Sin embargo, la posición 562 se encuentra sobre la superficie de interacción de KLC2 como también es accesible a solvente. Experimentos de dinámica molecular revelaron que el péptido de NIS mutante L562M presenta una menor energía libre de unión con KLC2 que el péptido de WT NIS (Figura 14F), lo cual indica que dicha mutación estabiliza el complejo proteico. Esta diferencia en la energía de unión es una consecuencia directa del cambio de aminoácidos en la posición 562, es decir la metionina produciría que NIS interactuara más fuertemente con KLC2 que la leucina (Figura 14G). Este aumento en la estabilidad del complejo NIS:KLC2 impediría que NIS se libere al llegar al complejo de Golgi, saturándose así el sistema de transporte entre RE y Golgi mediado por KLC2, llevando consecuentemente a la acumulación de NIS en el RE. La acumulación de proteína en compartimentos intracelulares debido a saturación de los sistemas de transporte intracelular ha sido asociada a condiciones fisiológicas anormales (273,274). La saturación del sistema de transporte mediado por KLC2 conduciría a una disminución de la expresión de NIS en la membrana plasmática, conduciendo a una disminución en la acumulación de yoduro y consecuentemente a la instauración de un cuadro de hipotiroidismo congénito como sucede en el Paciente C.

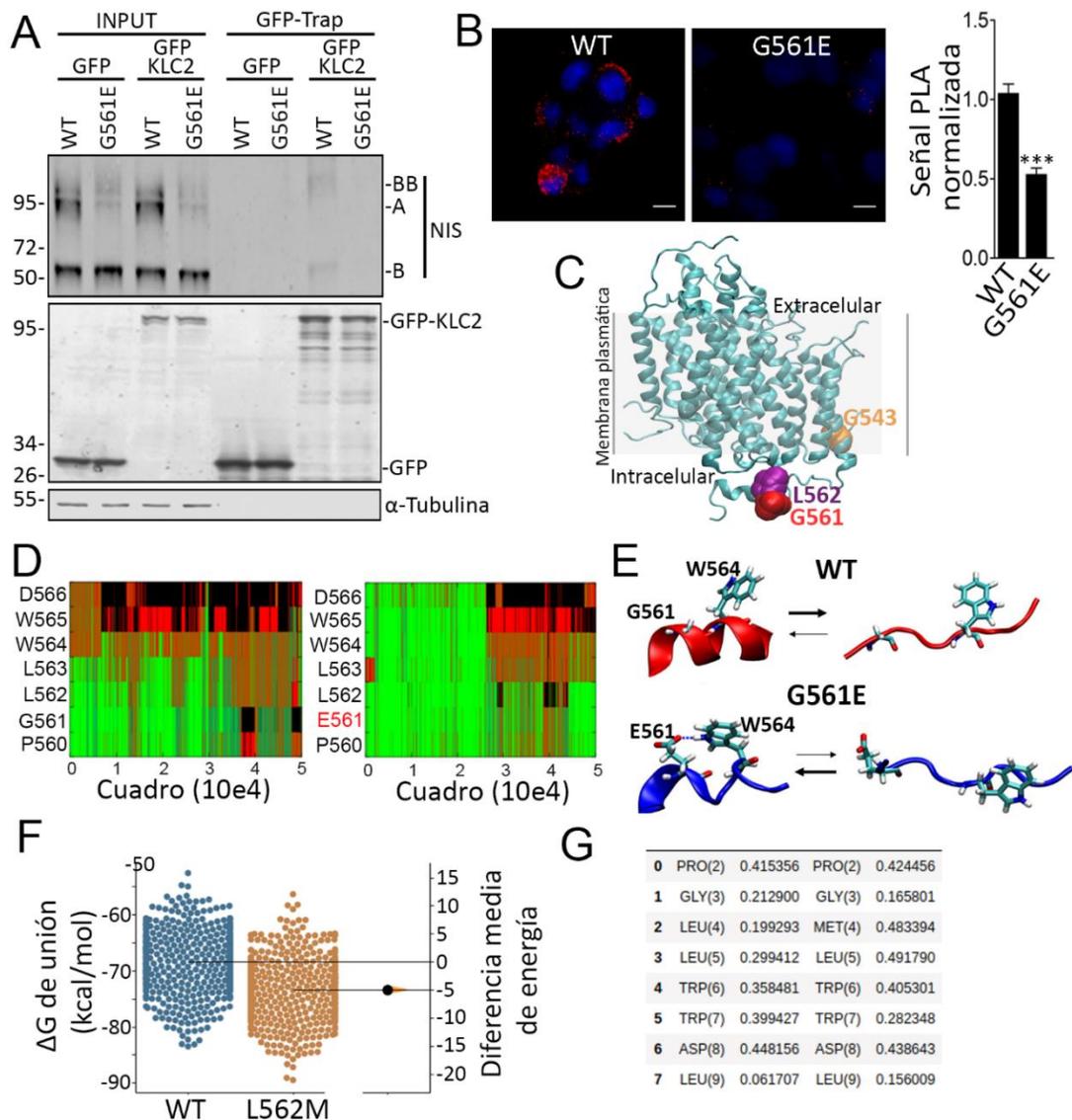


Figura 14. Las mutantes G561E y L562M alteran la interacción de NIS con el adaptador KLC2. **A.** Ensayo de Western blot analizando el material inmunoprecipitado mediante GFP-Trap en células MDCK-II expresando establemente WT o G561E NIS transfectadas de forma transiente con GFP o GFP-KLC2. El control de carga (INPUT) y los eluatos (GFP-Trap) se evaluaron con anticuerpos anti-hNIS, anti-GFP y anti- α -Tubulina (control de purificación). (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado, (BB) dímero de péptido parcialmente glicosilado. **B.** Ensayo de ligación por proximidad (PLA) en células HEK-293T co-transfectadas con WT o G561E NIS y GFP-KLC2. La señal de PLA normalizada se calculó analizando la señal fluorescente roja proveniente de células que expresan GFP-KLC2 (verdes). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μ m. *** $p < 0.0001$ (Student's t-test). **C.** Modelo de homología de NIS basada en la estructura de vSGLT (PDB ID: 2XQ2) y Mhp1 (PDB ID: 2JLN). Se detallan los residuos G543 (naranja), G561 (rojo) y L562 (violeta). **D.** Dinámica molecular analizando la estructura secundaria de los residuos que conforman el octapéptido P560-L567 en el contexto de WT y G561E NIS. El color verde indica formación de estructura secundaria α -hélice. **E.** Representación esquemática del equilibrio entre las formas desestructuradas y estructuradas (α -hélice) del octapéptido P560-L567 en el contexto de WT (péptido rojo) y G561E NIS (péptido azul). El residuo E561 forma enlace puente hidrógeno con W564 contribuyendo a la estabilidad de la conformación α -hélice. **F.** Energía libre de unión (ΔG , kcal/mol) entre el complejo del octapéptido WT NIS y L562M NIS con KLC2. Se realizaron 500 réplicas de las dinámicas moleculares de ambos complejos. **G.** Contribución energética específica de cada aminoácido del octapéptido a la energía libre de unión del complejo.

4.4 Relevancia del motivo monoleucina (578-EEVAIL-583) del carboxilo terminal en el transporte de NIS a la membrana basolateral de células polarizadas

Como se mencionó en la sección 4.1.3, se identificó un motivo basado en leucina en el carboxilo terminal de NIS (constituido por los residuos 578-EEVAIL-583) que es importante para el transporte de NIS a la membrana plasmática. Como se realizó para el motivo triptófano ácido, se procedió a analizar en detalle la región que comprende el motivo mediante el alineamiento múltiple de secuencias. Dicho alineamiento reveló que los únicos residuos del motivo que se encuentran altamente conservados en mamíferos son los residuos ácidos y el residuo leucina (Figura 15A). En la posición correspondiente a la isoleucina que presenta la secuencia de hNIS (I582), otras especies presentan aminoácidos de características diferentes. Por ejemplo, la secuencia de NIS de rata, ratón, perro y vaca presenta en esta posición un residuo treonina, mientras que la secuencia de cerdo presenta una alanina. Esta observación nos condujo a pensar que este motivo corto de aminoácidos basado en leucinas es un motivo monoleucina, como el reportado para las proteínas factor estimulante de colonias-1, CD147, Amfirregulina y Betacelulina (147,275–277).

Como se demostró previamente (Figura 7) la disrupción de este motivo monoleucina conlleva a una disminución de la capacidad de transportar yoduro de células expresando de forma estable la proteína mutante debido a una disminución en la localización de la mutante de NIS en la membrana plasmática (Figura 15B-C). Además, encontramos que el patrón de glicosilación de la mutante I582A/L583A NIS es similar al que presenta la proteína WT (Figura 15D). Esto sugiere que la disrupción del motivo monoleucina no altera el tráfico de NIS de RE a Golgi, pero si altera el tráfico desde TGN a la membrana plasmática.

Es de destacar que la principal relevancia de esta clase de motivos radica en el transporte polarizado hacia la membrana plasmática basolateral de células polarizadas. Como se mencionó anteriormente, NIS presenta una expresión basolateral en los folículos tiroideos, transportando el yoduro desde el torrente sanguíneo hacia el interior de la célula folicular tiroidea.

Con el fin de indagar la posible participación del motivo monoleucina del carboxilo terminal en el transporte basolateral de NIS, se evaluó la localización sub-celular de las mutantes E578_L583del y I582A/L583A NIS que disrumpen el motivo monoleucina en células MDCK-II polarizadas transfectadas establemente. La línea celular MDCK-II constituye un modelo celular de epitelio bien caracterizado para el estudio de transporte polarizado de proteínas transmembrana (108) y ha sido ampliamente utilizado para estudiar la expresión polarizada de proteínas en el epitelio tiroideo. De hecho, células MDCK-II polarizadas recapitulan la expresión polarizada de varias proteínas de la glándula tiroidea, incluyendo la expresión basolateral de NIS y la expresión apical de TPO y el transportador de Na^+ /monocboxilatos (SMCT) (278,279). Es importante mencionar que monocapas de células MDCK-II polarizadas fueron cruciales para descubrir que NIS media el transporte activo del contaminante ambiental perclorato (15).

4.4.1 El motivo monoleucina determina la expresión basolateral de NIS

Con el objetivo de evaluar la relevancia del motivo monoleucina en el transporte basolateral de NIS, se generó una línea celular MDCK-II que expresa de forma estable una mutante de NIS en la cual se delecionaron los residuos comprendidos en la región 578-583 que forman el motivo monoleucina (E578_L583del). Al evaluar la localización de la mutante en células MDCK-II polarizadas, utilizando como marcador basolateral la proteína E-cadherina, se observó que la mutante se localiza predominantemente en la membrana apical (expresión basolateral: $40\pm 5\%$; expresión apical $67\pm 5\%$), a diferencia de la proteína WT NIS que se localiza principalmente en la membrana basolateral (expresión basolateral: $95\pm 5\%$; expresión apical: $5\pm 4\%$) (Figura 15E). En concordancia, al indagar en la localización de la mutante I582A/L583A NIS en células MDCK-II polarizadas, se observó que dicha proteína se encuentra principalmente en la membrana apical (expresión basolateral: $17\pm 10\%$; expresión apical: $85\pm 2\%$) (Figura 15F).

Con el fin de extender nuestro conocimiento acerca del motivo monoleucina, se procedió a evaluar la relevancia de dicho motivo en el transporte de NIS de rata (rNIS) a la membrana basolateral. Se generaron células MDCK-II expresando de forma estable WT rNIS y la mutante de L578A rNIS, que disrumpe el motivo monoleucina localizado entre los residuos 573-578 en la secuencia de rata. En concordancia con NIS humano, la proteína WT rNIS se localizó en la membrana basolateral (expresión basolateral: $98\pm 2\%$; expresión apical: $2\pm 1\%$). Por lo contrario, la mutante L578A rNIS presentó una localización mayoritaria en la membrana apical (expresión basolateral: $31\pm 5\%$; expresión apical: $69\pm 6\%$) (Figura 15G). Estas observaciones fueron validadas en la línea celular derivada de tiroides FRT, que si bien no expresa NIS de forma endógena, constituye el único modelo celular de célula folicular tiroidea que posee la capacidad de polarizar en monocapas epiteliales cuando se cultiva en soportes permeables (280). En células FRT polarizadas, WT rNIS presentó principalmente localización en la membrana basolateral (expresión basolateral: $93\pm 9\%$; expresión apical: $8\pm 7\%$), mientras que la mutante L578A rNIS presentó localización en ambos compartimentos de la membrana plasmática (expresión basolateral: $60\pm 5\%$; expresión apical: $35\pm 3\%$) (Figura 15H). Estos resultados demuestran que el motivo monoleucina, que se encuentra conservado en distintas especies, es clave para la expresión de NIS en la membrana basolateral.

4.4.2 La disrupción de otros motivos de aminoácidos identificados en el carboxilo terminal no altera el transporte basolateral de NIS

A fines de evaluar la existencia de otros motivos involucrados en el transporte basolateral de NIS se procedió a evaluar la localización de mutantes de NIS que disrumpen otros motivos de aminoácidos vinculados al transporte intracelular en la línea celular MDCK-II polarizada. Todas aquellas mutantes evaluadas en las secciones 4.1.2 y 4.1.3 que se expresan en la membrana plasmática de células no polarizadas fueron evaluadas en células MDCK-II polarizadas. Las mutantes mostraron localización mayoritaria en la membrana basolateral (Figura 16A y B), demostrando que ninguno de los motivos de aminoácidos alterados por estas mutantes está involucrado en el proceso de transporte basolateral de NIS.

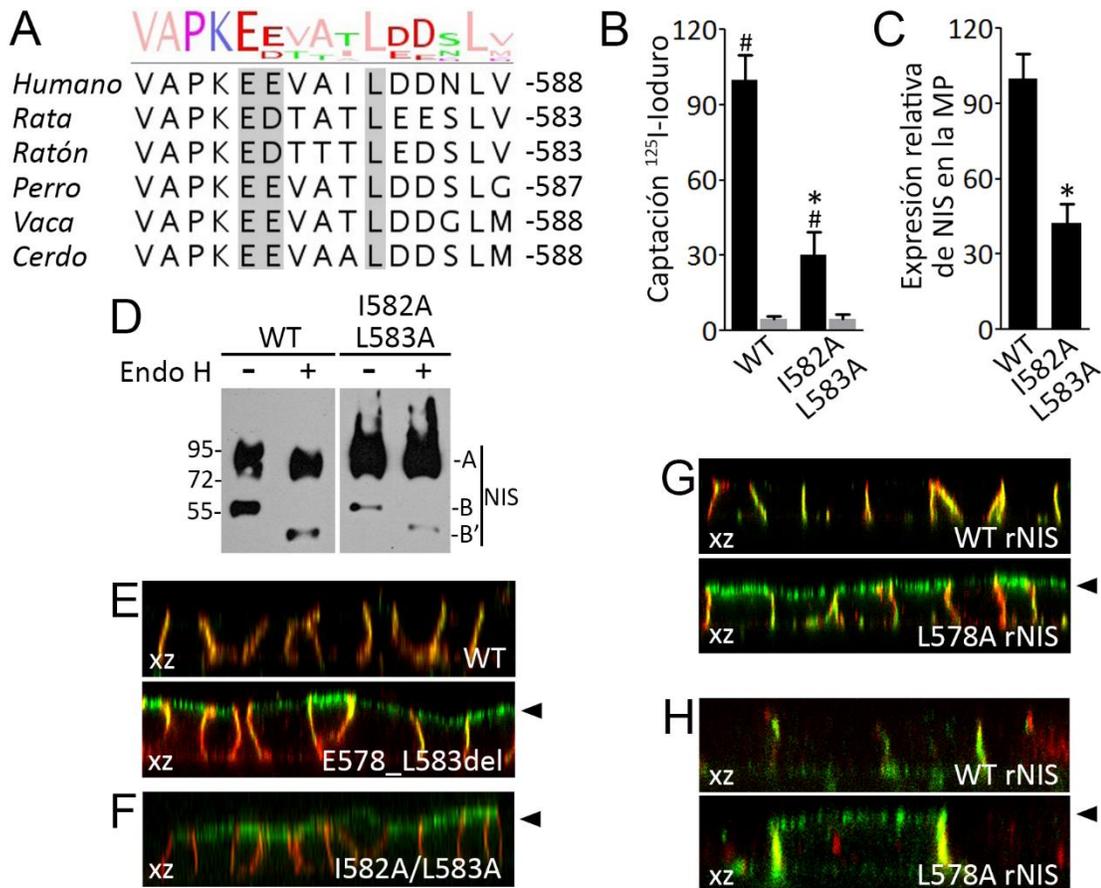


Figura 15. El motivo monoleucina carboxilo terminal es determinante para la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral. **A.** Alineamiento múltiple de secuencias de NIS mostrando el alto grado de conservación del motivo monoleucina E[E/D]xxxL. **B.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT y I582A/L583A NIS. Los resultados se expresan en pmol ioduro/μg ADN (ANOVA, Dunns post-test. #p<0.05: significancia respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05: significancia respecto a captación WT NIS). **C.** Cuantificación de la expresión relativa de WT y I582A/L583A en la membrana plasmática (MP) analizada mediante citometría de flujo. *p<0.05 (Mann-Whitney t-test). **D.** Western blot analizando cambios en el patrón electroforético de WT y I582A/L583A luego del tratamiento con Endo H. (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado, (B') péptido sin glicosilaciones. **E-G.** Proyección ortogonal (eje xz) de imágenes de microscopía confocal de células MDCK-II polarizadas en monocapas expresando de forma estable WT NIS o las mutantes E578_L583del (E) e I582A/L583A (F), o con la proteína WT NIS de rata (rNIS) y la mutante L578A rNIS (G). La expresión de NIS se muestra en verde y el marcador basolateral endógeno E-Caderina en rojo. La flecha negra indica la posición de la membrana apical. **H.** Proyección ortogonal (eje xz) de imágenes de microscopía confocal de células FRT polarizadas en monocapas expresando de forma estable con WT o L578A rNIS. La expresión de NIS se muestra en verde y el marcador basolateral endógeno E-Caderina en rojo. La flecha negra indica la posición de la membrana apical.

4.4.3 La proteína adaptadora de clatrina AP1B es requerida para el transporte basolateral de NIS

Los motivos cortos de aminoácidos que dirigen el transporte basolateral de proteínas, son generalmente reconocidos por proteínas adaptadoras citoplasmáticas. Particularmente las proteínas heterotetraméricas adaptadoras de clatrina (AP), en particular AP1A y AP1B, reconocen motivos basados en tirosina y motivos basados en leucinas dirigiendo a las proteínas cargo a la membrana plasmática. AP1B difiere de AP1A

únicamente en la subunidad μ . La subunidad μ 1A es de expresión ubicua, mientras que μ 1B es específica de epitelios. Además, AP1B ha sido vinculada principalmente al transporte basolateral de proteínas. A fines de indagar la relevancia de dicho complejo proteico en el transporte de NIS a la membrana plasmática basolateral, se procedió a evaluar la localización de WT NIS en células MDCK-II donde la expresión de μ 1B ha sido silenciada (MDCK-II μ 1B KD). La carencia de la subunidad μ 1B impide el ensamblaje del complejo proteico AP1B, redundando en su deficiencia funcional sin afectar otros complejos AP. La línea celular MDCK-II μ 1B-silenciada exhibe localización defectuosa en la membrana plasmática apical de varias proteínas marcadoras de la membrana plasmática basolateral, lo que evidencia la relevancia del complejo AP1B en el transporte basolateral de proteínas. Al evaluar la localización sub-celular de WT NIS en la línea celular MDCK-II μ 1B KD transfectada establemente se observó que presenta una localización mayoritaria en la membrana plasmática apical (expresión basolateral: $32\pm 7\%$, expresión apical: $65\pm 7\%$) (Figura 17A). En línea con la importancia del motivo monoleucina, estos resultados demuestran que el complejo AP1B es requerido para el transporte basolateral de NIS.

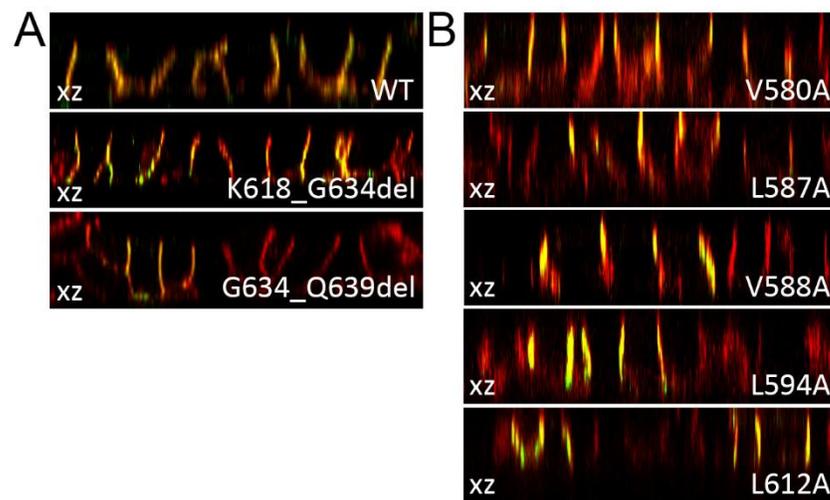


Figura 16. Los aminoácidos 618 a 634 no son requeridos para el transporte basolateral de NIS. A y B. Proyección ortogonal (eje xz) de imágenes de microscopía confocal de células MDCK-II polarizadas en monocapas expresando de forma estable WT NIS, deleciones del carboxilo terminal (A) o mutantes puntuales de motivos lineales cortos (B). La expresión de NIS se muestra en verde y el marcador basolateral endógeno E-Caderina en rojo.

Con el objeto de conocer a nivel estructural el reconocimiento del motivo monoleucina por el complejo AP1B, en colaboración con el laboratorio del Dr. Marcelo Martí, se procedió a realizar un modelado molecular *in silico* del péptido P576-D584 de NIS acomplejado a la subunidad σ 1 de AP1, que reconoce la o las leucinas de esta clase de motivos. Para esto se utilizó la estructura cristalina de la subunidad σ 1 de AP1 unida a la proteína viral u de HIV-1 (Vpu) (PDB ID: 4P6Z), la cual es un nonapéptido que contiene un motivo basado en leucina (ExxxLV) (281). Los experimentos de dinámica molecular demostraron que la subunidad σ 1 de AP1 forma un complejo estable con el péptido de la región del carboxilo terminal de NIS que contiene el motivo monoleucina en estudio. En particular, los residuos I582 y L583 de NIS se localizaron en un bolsillo hidrofóbico formado por los residuos Y62, L65, F67, V88 y V98 de las subunidad σ 1 de AP1 (Figura 17B-C). Para determinar la diferencia de afinidad entre el péptido WT y L583A de NIS, se calcularon las diferencias entre las energías libres de interacción de los péptidos con la subunidad σ 1 de AP1 ($\Delta\Delta G_B$). Al evaluar dicho parámetro, se observó que para la mutante L583A NIS la energía libre de unión se reduce en $2,9\pm 0,6$ Kcal/mol (Figura 17D), lo que se corresponde con una disminución de ~ 20 veces de la afinidad entre el nonapéptido y la subunidad σ 1 de AP1, lo cual demuestra la relevancia del residuo L583 en el reconocimiento del motivo. Estos resultados sugieren

que el motivo monoleucina localizado en el carboxilo terminal es reconocido por el complejo AP1B y requerido para el transporte de NIS a la membrana plasmática basolateral de células MDCK-II.

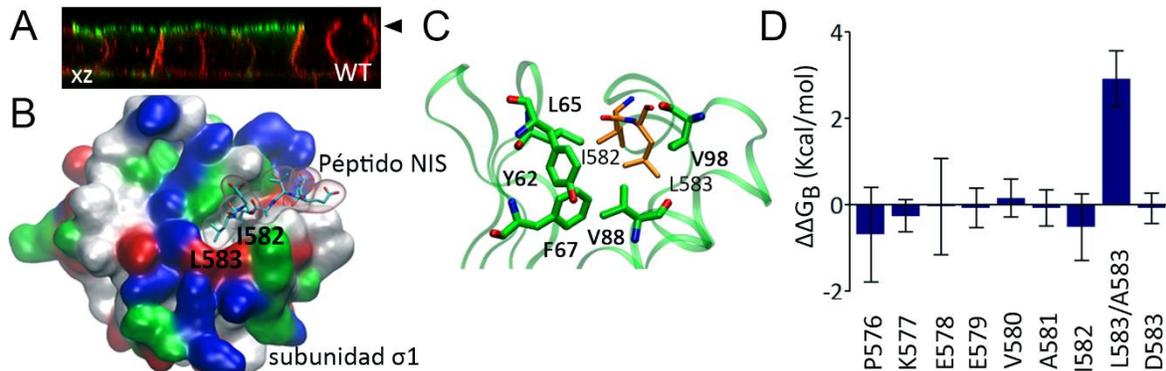


Figura 17. El complejo adaptador AP1B es clave para la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral. **A.** Proyección ortogonal (eje xz) de imágenes de microscopía confocal de células MDCK-II μ 1B KD polarizadas en monocapas expresando de forma estable con WT NIS. La expresión de NIS se muestra en verde y el marcador basolateral endógeno E-Caderina en rojo. **B.** Modelado molecular del péptido P576-D584 de NIS dentro de la cavidad de reconocimiento del motivo basado en leucina en la estructura cristalina de la subunidad σ 1 de AP1 (PDB ID: 4P6Z). Los residuos de la subunidad σ 1 fueron coloreados según sus características fisicoquímicas (Rojo: ácido, Azul: básico, Blanco: hidrofóbico/apolar, Verde: polar/hidrofílico). **C.** Detalle atómico molecular del bolsillo hidrofóbico de unión al motivo basado en leucina en la estructura de la subunidad σ 1 AP1 (verde). Los residuos hidrofóbicos que forman el sitio de unión se indican en verde. Los residuos I582 y L583 del péptido de NIS retenidos en la cavidad hidrofóbica se muestran en naranja. **D.** Contribución por residuo a la diferencia en los valores de energía libre de unión ($\Delta\Delta$ GB, Kcal / mol) entre los nanopéptidos P576-D584 de WT y L583A acomplejados a la subunidad σ 1 AP-1.

4.5 Relevancia del motivo PDZ tipo 1 (641-TNL-643) en el mantenimiento de NIS en la membrana basolateral

El tercer motivo de aminoácidos identificado en la región carboxilo terminal en función de su importancia para la expresión de NIS en la membrana plasmática es un motivo PDZ tipo 1 ([T/S]X Φ _{COOH}) conformado por los últimos tres aminoácidos del transportador (641-TNL-643). Los motivos PDZ son motivos reconocidos por proteínas con dominios PDZ que pueden asistir el transporte intracelular de proteínas de membrana o mantenerlas en determinados compartimentos membranosos, es decir anclándolas en una determinada localización (224). El principal reporte relacionado con la fisiología de la glándula tiroides revelando la importancia de los motivos y dominios PDZ en proteínas fue realizado por Lahuna *et al.* (231). En este trabajo, los autores demuestran que el TSHR presenta un motivo PDZ tipo 1, constituido por los últimos tres aminoácidos de la proteína, que interviene en el proceso de localización del receptor en la membrana plasmática. Significativamente, el motivo PDZ tipo 1 presente en TSHR, constituido por los residuos TVL, presenta una alta similitud con el motivo PDZ tipo 1, conformado por los residuos TNL, identificado en el carboxilo terminal de NIS. Esto nos condujo a pensar la posibilidad de la existencia de una regulación similar en ambas proteínas mediada por motivos PDZ y proteínas que con ellos interaccionan.

Como se realizó para los motivos anteriores, se analizó mediante alineamiento múltiple el grado de conservación del mencionado motivo PDZ tipo 1 de NIS. Todas las especies de mamíferos analizadas poseen un motivo PDZ tipo 1 constituido por los aminoácidos TNL o similares (Figura 18A). La única secuencia de NIS de mamíferos que presenta diferencias a la de humano es la de vaca, en donde el motivo estaría formado por

los residuos ANL. El reemplazo de la treonina por un residuo alanina no parecería representar un cambio estérico significativo, pero sí un cambio en algunas de las propiedades del motivo dado que la treonina presenta un grupo hidroxilo en la cadena lateral mientras que la alanina posee un grupo metilo. El otro cambio es la sustitución del ácido glutámico del motivo de hNIS por un residuo serina. Si bien la serina es un aminoácido polar al poseer un grupo hidroxilo en su cadena lateral, difiere del ácido glutámico en no poseer una carga neta negativa. Sin embargo, fosforilaciones en residuos serinas dotan a estos aminoácidos de una carga neta negativa pudiendo de esta manera adquirir funcionalidades similares a la de los residuos ácidos. Por otra parte, el análisis del carboxilo terminal de NIS en aves y anfibios reveló la presencia de motivos PDZ tipo 1 conformados por las secuencias SHV y SRV. Si bien difieren de los hallados en mamíferos, respetan el consenso de los motivos PDZ tipo 1. En el caso de la secuencia de NIS en peces no se pudo identificar un motivo PDZ canónico. Este análisis demuestra el alto grado de conservación del motivo PDZ tipo 1 de NIS, lo cual devela la importancia de estos residuos en la fisiología de la proteína.

La disrupción del motivo PDZ conlleva a una disminución de la localización de NIS en la membrana plasmática y una disminución de la capacidad de transportar yoduro de las células que expresan dicha mutante (Figura 6). Estos resultados sugieren un rol importante de este motivo en los mecanismos que regulan la expresión de NIS en la membrana plasmática.

4.5.1 La disrupción del motivo PDZ tipo 1 produce la re-localización de NIS en cuerpos vesiculares intracelulares

A fines de profundizar en el estudio de la relevancia del motivo PDZ tipo 1 del carboxilo terminal en la expresión de NIS en la membrana plasmática, se generó una línea celular MDCK-II que expresa de forma estable la mutante en la cual se delecionaron los últimos tres aminoácidos de NIS (T641X NIS) y por ende, carece del motivo PDZ. Como se observó anteriormente, las células que expresan la mutante T641X NIS presentan una severa reducción en su capacidad de acumular yoduro (Figura 18B), debido a una reducción de su localización en la membrana plasmática como se develó mediante citometría de flujo (Figura 18C). En cuanto al patrón de glicosilación de la mutante, mediante WB se observó que no difiere del patrón de la proteína WT, por lo que la disminución en la expresión de la proteína en la membrana plasmática se debería a un defecto en el transporte posterior al complejo de Golgi (Figura 18D). Además, mediante microscopía confocal se determinó que la mutante T641X NIS presenta mayoritariamente una localización intracelular en cuerpos vesiculares (Figura 18E). Si bien la disrupción del motivo PDZ tipo 1 conduce a la localización de NIS en compartimentos intracelulares, parece no tener un efecto total en la relocalización de NIS ya que también se observa expresión de la proteína en la membrana plasmática. Con el objeto de descartar la posibilidad de que la delección de los últimos tres aminoácidos de NIS conlleve a la conformación de nuevos motivos PDZ o de transporte, se procedió a reemplazar los últimos tres aminoácidos que componen el motivo PDZ por residuos alaninas dando lugar a la mutante de T641A/N642A/L643A NIS (TNL>AAA NIS). Del mismo modo que se procedió con la mutante T641X NIS, se evaluó la localización de la nueva mutante TNL>AAA NIS en células MDCK-II. En consonancia con los resultados evidenciados para la mutante T641X la mutante TNL>AAA NIS presentó una disminución en su capacidad de transportar yoduro (Figura 18F), y una disminución en su localización en membrana plasmática con la concomitante aparición de NIS en cuerpos vesiculares intracelulares (Figura 18G-H).

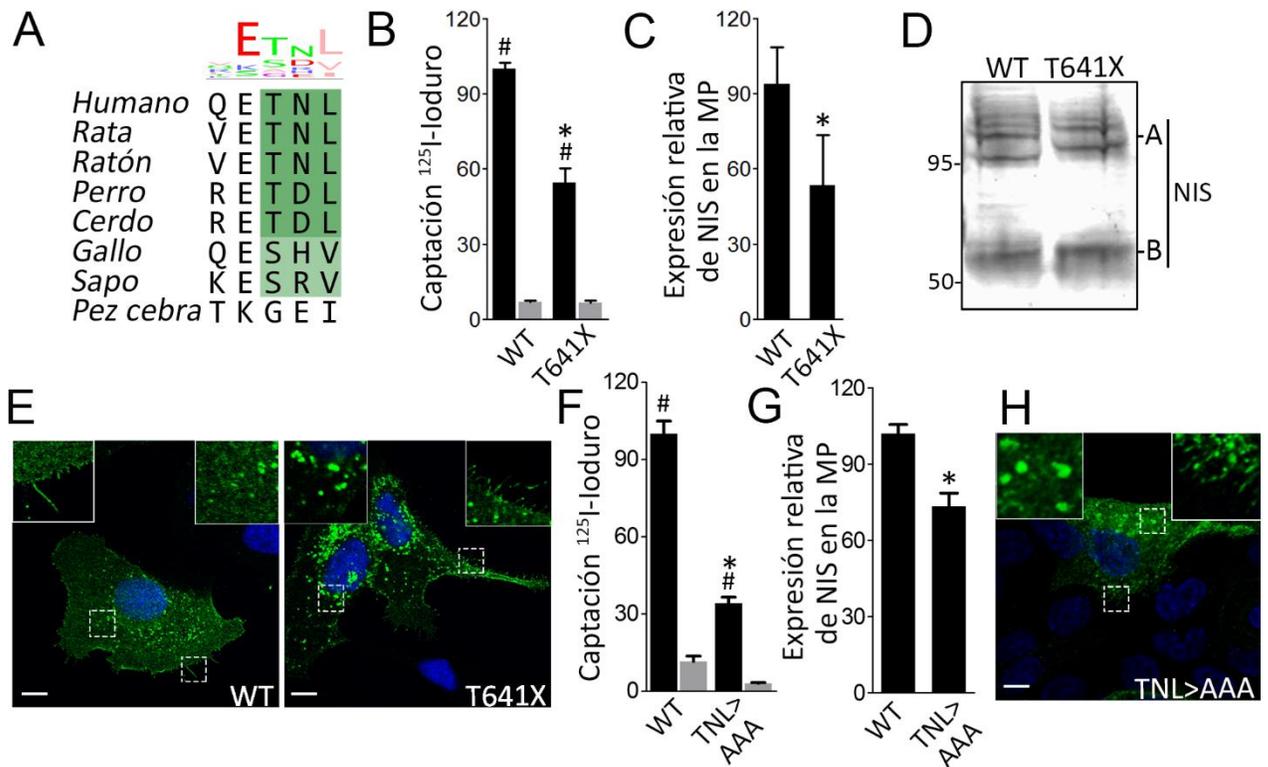


Figura 18. El motivo PDZ tipo 1 carboxilo terminal es importante para la expresión de NIS en la membrana plasmática. **A.** Alineamiento múltiple de secuencias de NIS indicando la conservación del motivo PDZ clase I [S/T]xΦ_{COOH}. **B.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT y T641X NIS. Los resultados se expresan en pmol ioduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **C.** Cuantificación de la expresión relativa de WT y T641X NIS en la membrana plasmática analizada mediante citometría de flujo. *p<0.05 (Mann-Whitney t-test). **D.** Western blot analizando el patrón electroforético de WT y T641X NIS. (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado. **E.** Microscopía confocal analizando la expresión de WT y T641X NIS en células MDCK-II permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-hNIS (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm. **F.** Captación de ¹²⁵I-ioduro en células MDCK-II expresando de forma estable WT y TNL>AAA NIS. Los resultados se expresan en pmol ioduro/μg ADN. #p<0.05 respecto a inhibición con perclorato. *p<0.05 respecto a captación de WT NIS (ANOVA, Dunns post-test). **G.** Cuantificación de la expresión relativa de WT y TNL>AAA NIS en la membrana plasmática analizada mediante citometría de flujo. *p<0.05 (Mann-Whitney t-test). **H.** Microscopía confocal analizando la expresión de WT y TNL>AAA NIS en células MDCK-II permeabilizadas marcadas con anticuerpos anti-NIS (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μm.

Luego, procedimos a analizar el efecto de la remoción del motivo PDZ en la localización de NIS en células MDCK-II polarizadas. Mediante microscopía confocal se observó que la remoción del motivo PDZ tipo 1 no imposibilita la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral, aunque disminuye su expresión en este compartimento debido a la re-localización de la proteína hacia vesículas intracelulares (Figura 19A). Adicionalmente, se investigó la relevancia del motivo PDZ en la localización de rNIS en epitelios polarizados a fines de conocer la importancia evolutiva de este motivo. Se evaluó la localización de la mutante T616X rNIS en células MDCK-II polarizadas transfectadas establemente. En concordancia con lo observado en la mutante T641X NIS, la mutante T616X rNIS se localiza en compartimentos vesiculares intracelulares y en la membrana plasmática basolateral (Figura 19B). La cuantificación del número de vesículas conteniendo NIS mostró diferencias significativas en el caso de células transfectadas con WT NIS y las mutantes que carecen del motivo

PDZ (Figura 19C). Tomados en su conjunto, estos resultados nos permiten concluir que el motivo PDZ tipo 1 es clave para la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral.

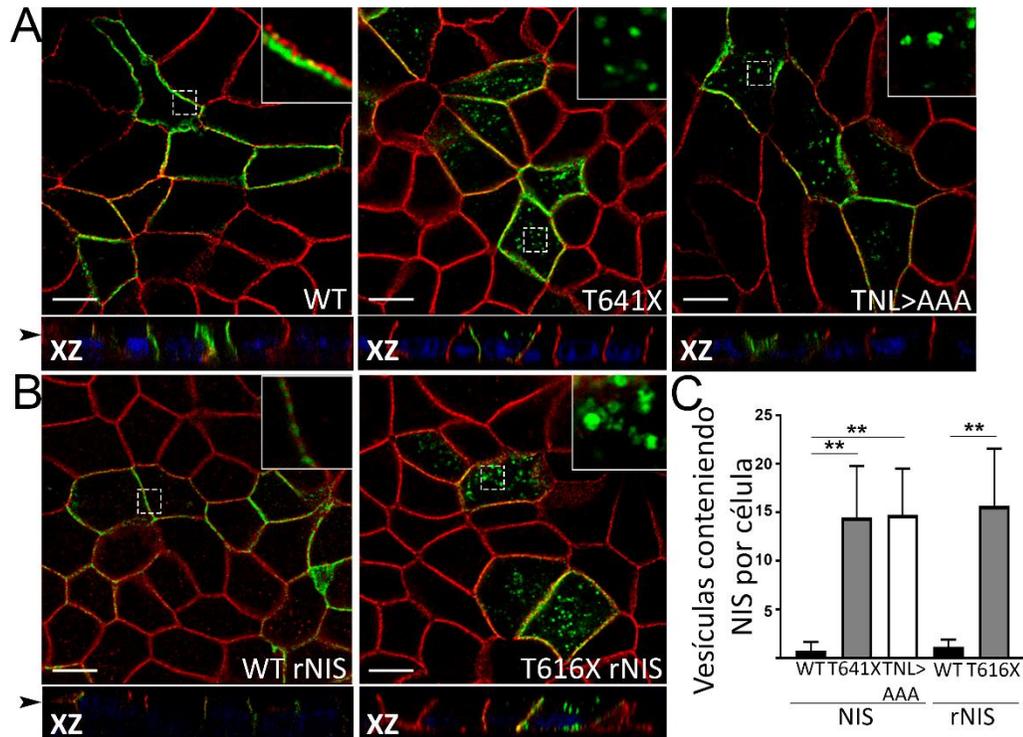


Figura 19. El motivo PDZ tipo 1 carboxilo terminal es importante para la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral de células epiteliales polarizadas. A y B. Imagen xy y proyección ortogonal (eje xz) de imágenes de microscopía confocal de células MDCK-II polarizadas en monocapas expresando de forma estable WT, T641X o TNL>AAA NIS (A) y con WT o T616X rNIS (B). La expresión de NIS se muestra en verde y el marcador basolateral endógeno E-Caderina en rojo. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μ m. La flecha negra indica la posición de la imagen xy que se muestra en el panel superior. **C.** Cuantificación de cuerpos vesiculares conteniendo NIS en células MDCK-II polarizadas en monocapas expresando de forma estable las mutantes indicadas. **p<0.01 (ANOVA, Dunns post-test).

4.5.2 La remoción del motivo PDZ tipo 1 conduce a la re-localización de NIS hacia endosomas tardíos y lisosomas

A fines de conocer la naturaleza de los compartimentos vesiculares en los cuales se localiza T641X NIS, se procedió a realizar ensayos de co-localización con diferentes marcadores endosomales o de organelas. Para ello se generaron células MDCK-II expresando de forma estable la mutante T641X NIS y diferentes proteínas marcadoras de compartimentos intracelulares fusionadas a GFP. Se optó por analizar la co-localización de la mutante de NIS con los marcadores Rab4a (marcador de endosomas de reciclado), Rab5 (marcador de endosomas tempranos), Rab14 (marcador de vesículas de TGN a endosomas), CD63 (marcador de endosomas tardíos) y Lamp1 (marcador de lisosomas). Se analizó mediante microscopía confocal la localización subcelular de T641X NIS y los diferentes marcadores vesiculares y, posteriormente, se cuantificó la co-localización midiendo el coeficiente de Manders (M2) para cada co-transfección. Se encontró que una fracción de T641X NIS colocaliza con marcadores vesiculares Rab4a, Rab14 y Rab5 en una baja proporción ($0.4 < M2 < 0.6$) (Figura 20A-B), mientras que presenta una mayor co-localización con vesículas positivas para los marcadores CD63 y Lamp1 ($M2 > 0.75$) (Figura 20B). Estos resultados indican que la remoción del motivo PDZ conduce a la

endocitosis de NIS mediada por clatrina (co-localización con CD63) que finalmente conduciría a la degradación del transportador por vía lisosomal (co-localización con Lamp1). Si bien es sabido que NIS se degrada por vía lisosomal en un proceso mediado por la activación de la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) (282), nos preguntamos si la carencia del motivo PDZ exacerbaba la internalización de la proteína y su posterior degradación en lisosomas. Para responder esta pregunta decidimos analizar el grado de co-localización que presenta WT NIS tanto con CD63 como con Lamp1 y comparar estos resultados con los obtenidos para T641X NIS. WT NIS presenta un nivel menor de co-localización con CD63 y con Lamp1 ($0.5 < M2 < 0.65$), en comparación con T641X NIS que presenta mayores niveles de co-localización ($M2 > 0.75$) (Figura 20C-D). Estos resultados sugieren que el motivo PDZ estabilizaría la expresión de NIS en la membrana plasmática y que su remoción exacerbaba la internalización de la proteína y su posterior degradación por vía lisosomal.

Por otra parte, nos preguntamos si el aumento de localización de T641X NIS en lisosomas conduce a una mayor degradación de la proteína. Para responder esta pregunta inhibimos la función lisosomal con Bafilomicina que inhibe la bomba de protones que acidifica la organela en células MDCK-II expresando establemente WT y T641X NIS y analizamos su patrón electroforético mediante WB. No se observaron diferencias significativas en la cantidad total de WT NIS entre las células control y aquellas tratadas con Bafilomicina, como tampoco diferencias en el grado de glicosilación de WT NIS (Figura 20E). Sin embargo, se observó un incremento en la cantidad total de T641X NIS al tratar las células con Bafilomicina con respecto a las células control. Además se observó un incremento de la forma madura de NIS (A) con respecto a la forma inmadura (B) en el tratamiento con Bafilomicina (Figura 20E). Estos resultados revelan que la remoción del motivo PDZ de NIS exacerbaba la degradación de la proteína por la vía lisosomal. En conclusión, el motivo PDZ estabiliza la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral, reduciendo la degradación por la vía lisosomal de la forma madura de la proteína.

4.5.3 Identificación de proteínas con dominio PDZ capaces de reconocer el motivo PDZ de NIS

Teniendo en cuenta la relevancia del motivo PDZ en el transporte de NIS a la membrana plasmática, se abordó la identificación de las proteínas con dominio PDZ que pudiesen interactuar con NIS mediante el reconocimiento del motivo PDZ regulando su localización en la membrana plasmática. En colaboración con el Dr. Thierry Pourcher (Université de Nice Sophia Antipolis, Francia) se realizó una pesquisa utilizando el microarreglo comercial de proteínas con dominio PDZ inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa (fase sólida) PDZ Domain Array (Panomics/Affymetrix) que pudiesen reconocer una versión recombinante de la región 551-643 del carboxilo terminal de NIS humano fusionada en su extremo amino terminal a Tiorredoxina y una etiqueta de histidinas interrumpidos por un sitio de clivaje para enteroquinasa (TRX-6xHis-EK-551-643NIS). El análisis reveló un total de veinte proteínas inmovilizadas con dominio PDZ capaces de interactuar con el carboxilo terminal de NIS¹. Complementariamente, se realizó un análisis bibliográfico para filtrar los resultados en función del tipo de motivo PDZ reconocido, la expresión en la célula folicular tiroidea y la línea celular MDCK-II y la localización sub-celular en epitelios polarizados a fines de identificar proteínas con dominio PDZ capaces de interactuar con NIS de relevancia fisiológica en la célula folicular tiroidea. De estas diez

¹ Los resultados conforman la tesis doctoral de la Dra. Elizabeth Darrouzet dirigida por el Dr. Thierry Pourcher.

proteínas, SNB1(CDC27) presenta localización nuclear y NHERF1 y NHERF2 expresión apical, por lo cual fueron descartadas. Las siete restantes presentan localización basolateral pero solo dos de ellas presentan dominios PDZ capaces de interactuar con motivos tipo 1 como el constituido por los últimos cuatro aminoácidos de NIS. Entre estos se encuentran los dominios PDZ 1, 2 y 4 de la proteína polar SCRIB. En particular SCRIB ha sido reportada como una proteína que interactúa con el TSHR a través del motivo PDZ (283). Es por esto que los estudios de interacción entre el motivo PDZ tipo 1 del carboxilo terminal de NIS los hemos centrado en la interacción con la proteína SCRIB.

Con el objetivo de validar la interacción NIS:SCRIB, la construcción recombinante TRX-6xHis-EK-551-643NIS y aquella careciendo del motivo PDZ (TRX-6xHis-EK-551-640NIS) fueron inmovilizadas en columnas Ni Sepharose High Performance His-Trap HP (GE Life Sciences) para ser utilizadas como anzuelo en ensayos de pull-down con lisados totales de células HEK293T transfectadas con GFP-SCRIB o GFP-SCRIB careciendo de sus cuatro dominios PDZ (GFP-SCRIB Δ PDZ). La presencia de GFP-SCRIB únicamente en los eluatos de columnas conteniendo el carboxilo terminal de NIS completo confirmó la interacción NIS:SCRIB identificada. Además, la interacción NIS:SCRIB fue verificada en un modelo *in vivo* de células PCCL3 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación.

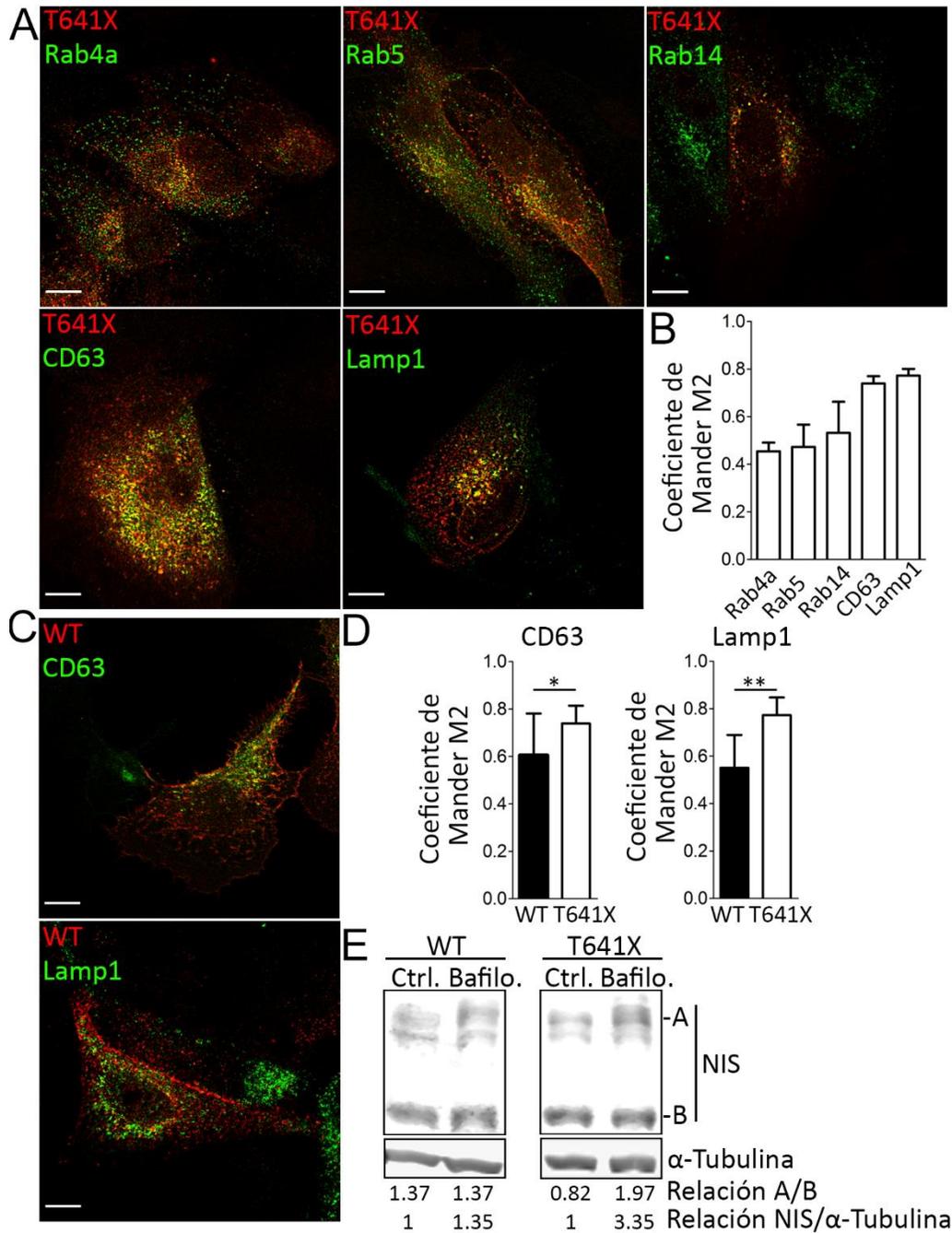


Figura 20. La remoción del motivo PDZ carboxilo terminal conduce a la relocalización de NIS hacia endosomas tardíos y lisosomas. A. Microscopía confocal analizando la expresión de T641X NIS en células MDCK-II permeabilizadas y co-transfectadas de forma estable con diversos marcadores fusionados a GFP (verde): Rab4a-GFP, Rab5-GFP, Rab11-GFP, CD63-GFP y Lamp1-GFP. La expresión de NIS se indica en rojo. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μ m. **B.** Análisis del grado de co-localización de T641X NIS con distintos marcadores utilizando el coeficiente de Mander M2. Para el cálculo del coeficiente se utilizaron entre 5 y 10 células. **C.** Microscopía confocal analizando la expresión de WT NIS en células MDCK-II permeabilizadas y co-transfectadas de forma estable con los marcadores CD63 y Lamp1 fusionados a GFP (verde). NIS fue marcado con anticuerpos anti-NIS (KELE) (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μ m. **D.** Análisis de co-localización diferencial de WT NIS y T641X NIS con los marcadores CD63 (panel izquierdo) y Lamp1 (panel derecho). Para el cálculo del coeficiente se utilizaron entre 5 y 10 células para cada condición. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-

Whitney t-test). E. Western blot analizando el nivel de expresión y el patrón electroforético de WT NIS y T641X NIS luego del tratamiento con 100 nM Bafilomicina (Bafilo.) durante 6 hs. A modo de control (Ctrl.) se utilizó un lisado de células que no fueron tratadas con Bafilomicina. (A) Péptido completamente glicosilado, (B) péptido parcialmente glicosilado. α -Tubulina control de carga. La relación A/B evidencia la relación de densidades de la banda A con respecto a la densidad de la banda B. El ratio NIS/ α -Tubulina indica la relación de densidades de NIS total (A+B) respecto a la densidad de α -Tubulina; en este caso los resultados han sido normalizados respecto a cada una de las condiciones control.

4.5.4 SCRIB interacciona con el motivo PDZ tipo I regulando la localización de NIS en la membrana plasmática

Con el objetivo de conocer si la interacción entre NIS y SCRIB ocurre en la membrana plasmática celular, co-transfectamos células PCCL3 con WT NIS o T641X NIS y GFP-SCRIB y analizamos luego localización subcelular de las proteínas. Mediante microscopía confocal de fluorescencia se evidenció la co-localización de WT NIS con SCRIB en la membrana plasmática celular pero no así de la mutante T641X NIS con SCRIB (Figura 21A). En aquellas células PCCL3 en las cuales se evidenció co-localización entre NIS y SCRIB se procedió a analizar la interacción entre ambas proteínas evaluando la transferencia de la energía resonante de Förster (FRET) por fotoblanqueo del aceptor. Para que la transferencia de energía se concrete ambas moléculas deben encontrarse a menos de 10 nm de distancia, lo cual evidencia interacción entre ambas proteínas. Al evaluar mediante FRET aquellas regiones de membrana plasmática que presentaron co-localización entre NIS y SCRIB, pudo evidenciarse el aumento de la fluorescencia del fluoróforo dador luego de fotoblanquear el fluoróforo aceptor, lo cual es indicativo de la presencia de FRET (Figura 21B). La eficiencia de FRET llegó incluso en algunos casos hasta el 42%, en claro contraste con el control negativo en donde se observan eficiencias de FRET debajo del 19%. Estos resultados corroboran la interacción entre NIS y SCRIB en la membrana plasmática de la célula folicular tiroidea.

A fines de entender a nivel atómico molecular la interacción entre NIS y SCRIB, realizamos un modelado molecular del péptido de NIS conteniendo el motivo PDZ tipo 1 y el dominio PDZ 1 de SCRIB basándonos en la estructura tridimensional del cristal del complejo Scribble: β -PIX (PDB ID: 5VWI) (269). En este modelo molecular, se observa que el motivo PDZ de NIS se encuentra en interacción con un bolsillo mayormente hidrofóbico del dominio PDZ 1 de SCRIB (Figura 21C). Por otra parte, los aminoácidos polares del motivo PDZ interactúan con parches hidrofílicos o polares de dicho dominio. Nuevamente, y como se observó para los modelos anteriores, el motivo PDZ de NIS se encuentra en una conformación desestructurada para poder interactuar con el dominio PDZ de SCRIB.

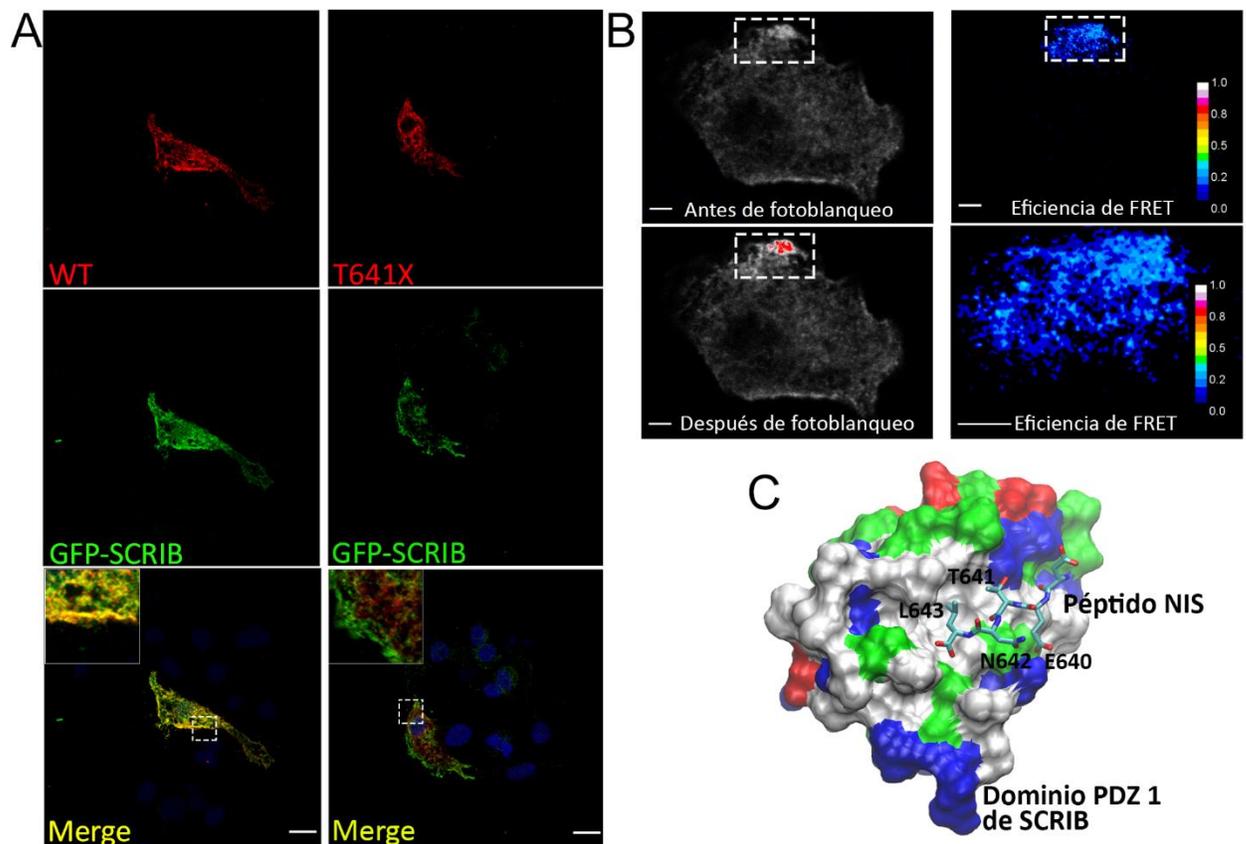


Figura 21. NIS interacciona con SCRIB en la membrana plasmática de células tiroideas. **A.** Microscopía confocal analizando la co-localización de WT o T641X NIS con GFP-SCRIB en células PCCL3 permeabilizadas. NIS fue marcado con anticuerpos anti-NIS (KELE) (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Escala: 10 μ m. **B.** Análisis de interacción entre NIS y SCRIB mediante FRET por fotoblanqueo del aceptor. El recuadro blanco punteado representa el sitio donde se realizó el fotoblanqueo del fluoróforo aceptor y donde se evaluó la eficiencia de FRET. Escala: 10 μ m. **C.** Modelo atómico molecular de la interacción del motivo PDZ tipo 1 carboxilo terminal de NIS con el dominio PDZ1 de SCRIB (PDB ID: 5VWI). Los residuos del dominio PDZ1 de SCRIB fueron coloreados según sus características físicoquímicas (Rojo: ácido, Azul: básico, Blanco: hidrofóbico/apolar, Verde: polar/hidrofílico).

4.5.5 En ausencia de SCRIB, NIS se localiza en compartimentos vesiculares

Considerando la relevancia del motivo PDZ en la expresión de NIS en la membrana plasmática, estudiamos la participación de SCRIB en el mencionado proceso. Implementando la herramienta de edición genómica CRISPR/Cas9, utilizando un ARN guía dirigido contra el exón 3 del gen que codifica para la proteína SCRIB, se generaron células MDCK-II deficientes en SCRIB (MDCK-II SCRIB KO) (Figura 22A). Se seleccionaron dos clones, de los cuales se extrajo el material genómico y se amplificó mediante PCR la región de interés (Figura 22B). La secuenciación de los productos de PCR evidenció la edición génica en ambos clones. El Clon 1 presentó una inserción de dos bases en el exón 3 del gen que codifica para SCRIB, en estado homocigota. El Clon 2 presentó una edición en estado de heterocigosis compuesta, presentando el alelo A una inserción de una base y el alelo B una inserción de ciento cincuenta bases (Figura 22B-C). Los tres eventos de inserción de bases ocurrieron en la región adyacente a la secuencia motivo adyacente al protoespaciador (PAM). Además, se generó una línea celular control transfectando células con la maquinaria de edición genómica de CRISPR/Cas9 pero sin un ARN

guía. La secuenciación de la región de interés del gen que codifica para SCRIB reveló que no hubo edición génica en esta región y por ende el material genético de estas células codifica para WT SCRIB.

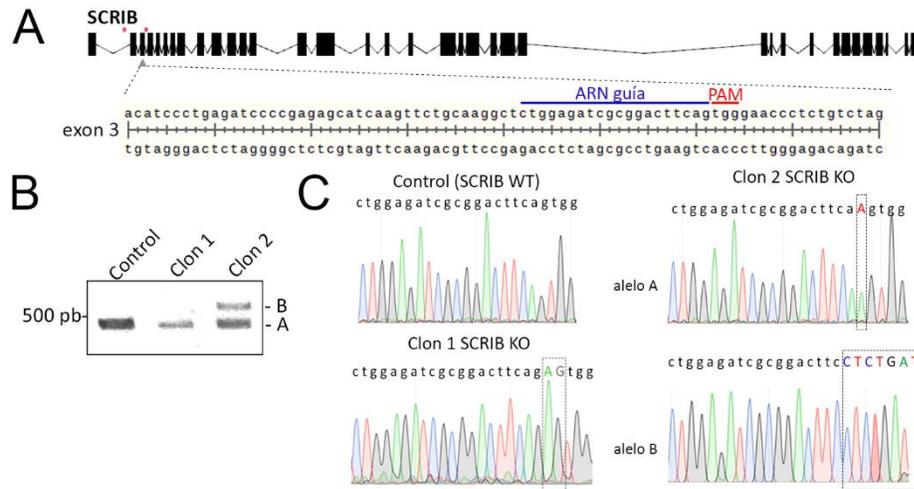


Figura 22. Análisis de la edición génica del gen que codifica SCRIB en células MDCK-II mediante la técnica de CRISPR/Cas9. A. Representación esquemática del gen que codifica para SCRIB en el genoma de perro. Los recuadros negros simbolizan los 36 exones. Los asteriscos rojos indican la zona de hibridación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar dicha región del genoma y verificar la edición génica. En la parte inferior se muestra la secuencia del exón 3 donde se dirigió el ARN guía para la edición mediante CRISPR/Cas9. En azul se indica la secuencia del ARN guía utilizado y en rojo la secuencia PAM de reconocimiento para la actividad endonucleasa de Cas9. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de clones sometidos a la edición génica mediante CRISPR/Cas9. La banda A se corresponde con el tamaño del producto de PCR esperado en la amplificación de WT SCRIB. **C.** Cromatogramas mostrando la secuencia nucleotídica del exón 3 correspondiente a la región de hibridación del ARN guía para el clon control (WT SCRIB) y los clones 1 (S32Rfs23X SCRIB) y 2 (Alelo A: S32Kfs5X SCRIB. Alelo B: S32Lfs1X SCRIB). En negro se indica la secuencia WT de SCRIB y en color las inserciones producto de la edición génica.

En el Clon 1, la inserción de dos bases produce un corrimiento del marco de lectura que lleva a la aparición de un codón de parada (terminación de la traducción) prematuro en la posición 55 de la proteína (S32Rfs23X SCRIB). Esta línea celular presenta un fenotipo de un mayor tamaño (área de núcleo: $240,71 \pm 78,74 \mu\text{m}^2$) y que al ser polarizada en filtros permeables forma una monocapa de menor altura (altura celular: $6,33 \pm 0,73 \mu\text{m}$) en comparación con células MDCK-II SCRIB WT (área de núcleo: $86,79 \pm 11,09 \mu\text{m}^2$, altura celular: $11,05 \pm 0,60 \mu\text{m}$) (Figura 23A-B). Estas características concuerdan con aquellas reportadas por Gujral *et al.* (284) quienes realizaron un silenciamiento de la expresión de SCRIB mediado por shRNA (284). Por otra parte, en el Clon 2 las inserciones de una base y ciento cincuenta bases producen corrimientos del marco de lectura que dan lugar a proteínas truncas (S32Kfs5X SCRIB y S32Lfs1X SCRIB). Si bien estas células forman una monocapa de menor altura (altura celular: $5,68 \pm 1,21 \mu\text{m}$), al igual que las provenientes del Clon 1, no presentan un mayor tamaño en comparación con la línea celular MDCK-II SCRIB WT (área de núcleo Clon 2: $77,92 \pm 24,67 \mu\text{m}^2$) (Figura 23A-B). En ambos clones, el análisis de la localización de proteínas marcadoras de dominios específicos de membrana plasmática (GP135: marcador apical. E-cadherina: marcador basolateral) no reveló variaciones significativas, sugiriendo el mantenimiento de la diferenciación de los compartimentos apicales y basolaterales (Figura 23C).

Se generaron células SCRIB WT y SCRIB KO expresando establemente NIS para evaluar la localización subcelular del transportador en células no polarizadas y polarizadas. En células no polarizadas no se evidenció un patrón

diferencial de NIS entre aquellas células que expresan o no SCRIB (Figura 23A). Sin embargo, en el modelo polarizado NIS presentó una disminución en la localización basolateral debido a una re-localización de la proteína en compartimentos vesiculares intracelulares (Figura 23B), al igual que se observó para la mutante de T641X NIS (Figura 19).

A fines de verificar la importancia de SCRIB en la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral, se realizó un ensayo de complementación co-transfectando células de los clones SCRIB KO con el vector de expresión de HA-NIS y vectores de expresión codificando GFP o GFP fusionado a la proteína SCRIB (GFP-SCRIB). Las células transfectadas con GFP-SCRIB presentaron expresión en la membrana plasmática basolateral de la proteína SCRIB y recuperación parcial del fenotipo celular. Por su parte, NIS presentó expresión en la membrana plasmática basolateral, co-localizando con GFP-SCRIB (Figura 23C). Sin embargo, en células complementadas con GFP no se observó recuperación fenotípica y NIS se localizó en cuerpos vesiculares intracelulares y membrana basolateral (Figura 23C), al igual que en las células SCRIB KO transfectadas únicamente con NIS (Figura 23B). Estos resultados demuestran que SCRIB estabiliza a NIS en la membrana plasmática basolateral a través de la interacción del motivo PDZ tipo 1 con los dominios PDZ de SCRIB.

4.6 Estudio de la expresión de los genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte de NIS a la membrana plasmática en el carcinoma papilar de tiroides

La capacidad de acumular yoduro mediada por NIS constituye la piedra angular del tratamiento de tumores tiroideos. Por más de 75 años, la terapia con yoduro radioactivo ha sido usada para eliminar metástasis provenientes de cáncer de tiroides y sus remanentes luego de la tiroidectomía. Sin embargo, muchos tumores son refractarios al tratamiento con yoduro radioactivo. El 80% de los carcinomas diferenciados de tiroides que expresan NIS, presentan una expresión intracelular del transportador, el cual se encuentra en compartimentos intracelulares, sugiriendo anomalías en el proceso de transporte de NIS a la membrana plasmática (76,78,80–83,285,286). Esta localización intracelular de NIS ha sido propuesta como una de las razones de la disminución de acumulación de yoduro radioactivo en células tumorales. A fines de entender las causas que conllevan a la retención intracelular de NIS en tumores tiroideos, se evaluó la expresión de aquellos genes que codifican para proteínas que se encuentran involucradas en el transporte de NIS a membrana plasmática en tejidos tiroideos normales y carcinomas papilares de tiroides (PTCs), utilizando datos provenientes secuenciación de ARN depositados en la base de datos Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA por sus siglas en inglés) (72). La simple clasificación de los carcinomas papilares según su análisis anatómico-patológico es escasa a la hora de diferenciar entre diversos subtipos tumorales. Según el perfil transcripcional, los carcinomas papilares pueden clasificarse en carcinomas BRAF-like o RAS-like (72). El análisis de la expresión de los genes KLC2, AP1M2 (μ 1B) y SCRIB, realizando la división de tumores según su perfil transcripcional evidenció que los tres genes se encuentran sobreexpresados en comparación con los tejidos normales (Figura 24A). Los resultados del análisis de los datos de TCGA nos conducen a pensar que la retención intracelular de NIS no se debe totalmente a la desregulación de los genes que codifican para aquellas proteínas que hemos identificado como reguladoras de los procesos de transporte intracelular de NIS y su expresión en la membrana plasmática celular. Teniendo en cuenta que los complejos AP1 están formados por cuatro subunidades y que la carencia

de cualquiera de ellas puede determinar la imposibilidad de armado del complejo, se analizó también el nivel de expresión de los genes que codifican para todas las subunidades de AP1 (AP1M1, AP1B1, AP1G1, AP1G2, AP1S1, AP1S2 y AP1S3) (Figura 24B). Además, existen distintas isoformas de las subunidades que forman el complejo AP1, como es el caso de las subunidades μ 1A y μ 1B (AP1M1 y AP1M2) o las subunidades σ 1-1, σ 1-2 y σ 1-3 (AP1S1, AP1S2 y AP1S3). Como ocurre con el gen que codifica para la subunidad μ 1B (AP1M2), los genes que codifican para las subunidades μ 1A (AP1M1), β 1 (AP1B1), σ 1-1 (AP1S1) y σ 1-2 (AP1S2) están sobreexpresados en PTC en comparación con el tejido tiroideo normal. Por contraparte los genes que codifican para las subunidades γ 1-1 (AP1G1) y σ 1-3 (AP1S3) están subexpresados en PTC en comparación con el tejido tiroideo normal (Figura 24B). Dada la alta promiscuidad que presentan estas subunidades al momento de formar el complejo proteico AP1, obtener alguna conclusión acertada únicamente por el análisis de estos resultados es limitada.

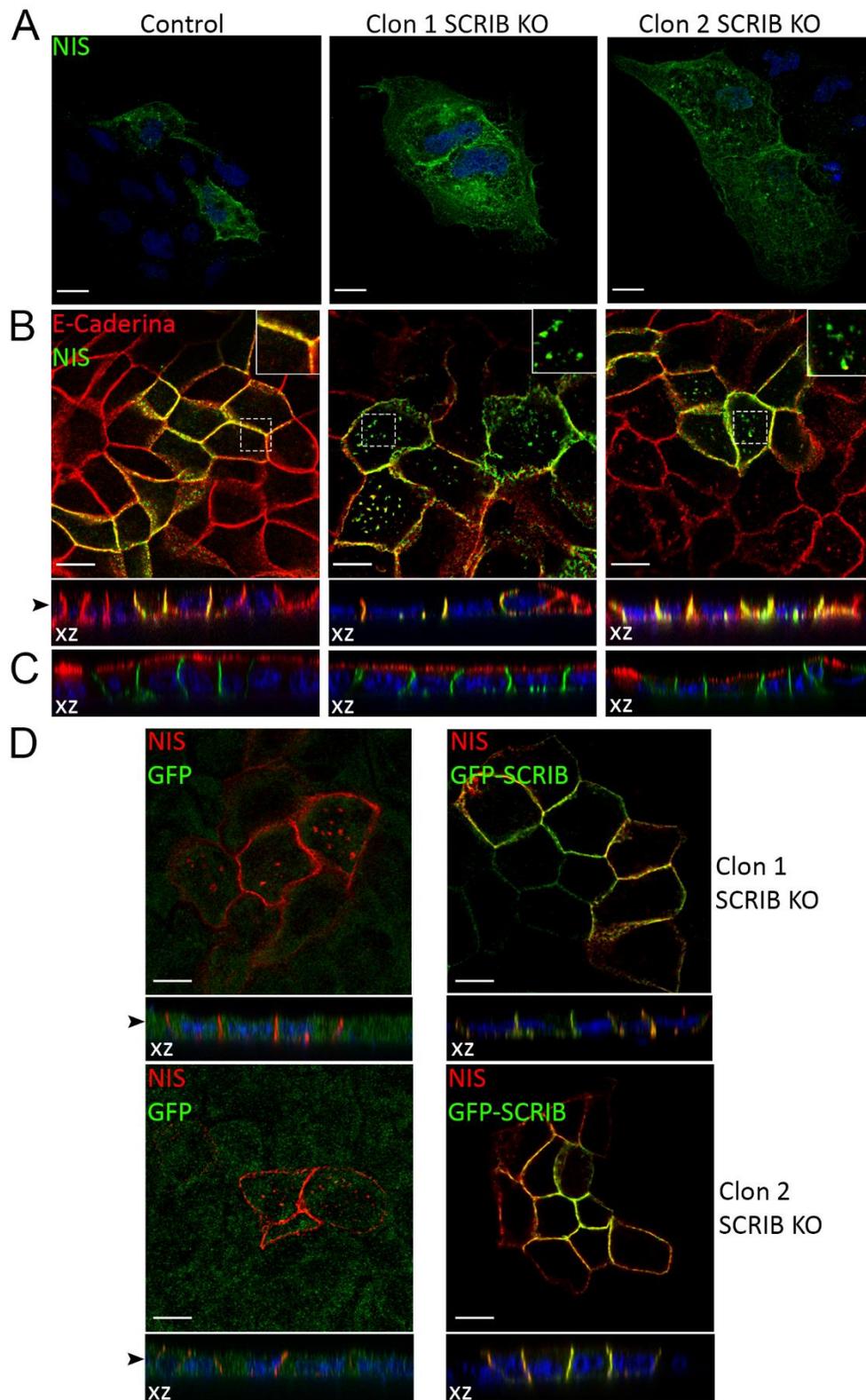


Figura 23. La deficiencia de SCRIB relocaliza la expresión de NIS en cuerpos vesiculares intracelulares en células MDCK-II polarizadas. A-C. Microscopía confocal analizando la localización de WT NIS en células MDCK-II control (SCRIB WT) y deficientes en SCRIB (SCRIB KO) no polarizadas (A) y polarizadas (B), marcadas con anticuerpos anti-NIS (verde). En las células polarizadas se utilizó como marcador basolateral endógeno E-Cadherina (rojo) (B) y como marcador apical

endógeno GP-135 (rojo) (C). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). La flecha negra indica la posición de la imagen xy que se muestra en el panel superior (B). Escala: 10 μ m. **D.** Microscopía confocal analizando la localización de WT NIS en células MDCK-II SCRIB KO (Clones 1 y 2) co-transfectadas con GFP (panel izquierdo) o GFP-SCRIB (panel derecho), marcadas con anticuerpo anti-NIS (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). La flecha negra indica la posición de la imagen XY que se muestra en el panel superior. Escala: 10 μ m.

Considerando que el conocimiento detallado de los procesos que modulan la expresión de NIS en la membrana plasmática en condiciones fisiológicas y sus defectos bajo condiciones patológicas permitirá una mejora sustantiva en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con tumores refractarios a la terapia con yodo radioactivo, futuros estudios son necesarios para dilucidar los mecanismos moleculares que mantienen la expresión de NIS retenida en compartimentos intracelulares en carcinomas tiroideos.

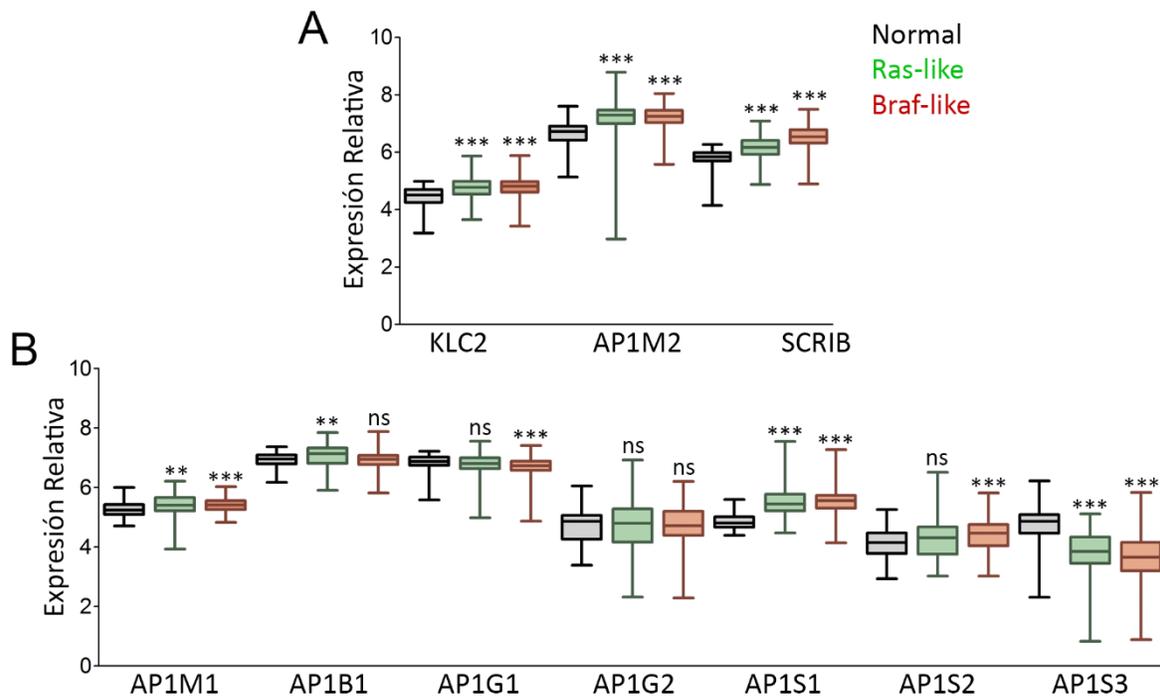


Figura 24. Las proteínas interactoras de NIS presentan expresión diferencial en carcinoma papilar de tiroides. A y B. Análisis de la expresión del ARNm de los genes codificantes para proteínas interactoras de NIS identificadas (A) y que forman parte del complejo AP1 (B). Los carcinomas fueron clasificados según su perfil transcripcional en Ras-like (verde) y Braf-like (rojos). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: no significativo (ANOVA, Dunns post-test).

4.7 Anexo I: Estudio de la presencia de motivos de aminoácidos similares a los de NIS en otras proteínas de la vía de biosíntesis de hormonas tiroideas

Una de las preguntas que surgió a lo largo del desarrollo de este trabajo fue si el resto de las proteínas transmembrana que participan en la biosíntesis de hormonas tiroideas poseen alguno de los motivos lineales de aminoácidos que presenta NIS, o algún otro motivo similar, y por ende presentan una regulación similar en los procesos de transporte intracelular. Para poder responder a esta pregunta se desarrolló un pequeño programa bioinformático utilizando el lenguaje de programación Python3 y el módulo de expresiones regulares (regular expressions - RE), el cual fue bautizado con el nombre de 'NIS motif finder'. Mediante el mismo se dirigió la búsqueda de motivos triptofano ácido, tirosina ácido (también reportado como interactor de KLC) (287), basado en tirosina (interacción con APs), dileucina/monoleucina ácido y PDZ tipo 1. Mediante los estudios realizados en este trabajo, particularmente los alineamientos múltiples de secuencia, se identificaron regiones flexibles a la variedad aminoacídica de cada motivo; es por esto que el software desarrollado presenta cierta flexibilidad en cuanto a ciertos aminoácidos que componen los motivos, a diferencia del software ELM. Otra ventaja del software desarrollado en este trabajo es la gran velocidad de procesamiento y la capacidad de modificación manual de la información de búsqueda en las secuencias proteicas. Por lo contrario, el software ELM es un software online, más lento y que no siempre tiene actualizada la base de datos de motivos de la cual se nutre. Sin embargo, el software ELM permite identificar un mayor número de motivos lineales de aminoácidos involucrados tanto en modificaciones post-traduccionales como en los procesos de transporte intracelular.

En cuanto a los resultados obtenidos con 'NIS motif finder', podemos decir que todas las proteínas de membrana involucradas en la síntesis de hormonas tiroideas poseen al menos un motivo de aminoácidos similar a los que presenta NIS, a excepción de TPO que parecería no compartir el tipo de motivos de aminoácidos con NIS (Tabla 6). El tipo de motivo más encontrado en estas proteínas es el motivo basado en tirosinas. Estos motivos interactúan con las subunidades μ de las APs ya sea en procesos de transporte a la membrana plasmática o en procesos de endocitosis mediada por clatrina (176,288). Si bien NIS posee un motivo basado en tirosina en la segunda región intracelular, cercano al residuo 124 caracterizado por Paroder *et al.* (59), la relevancia de este motivo en los procesos de transporte intracelular aún no ha sido indagada. De las cinco proteínas analizadas, tan solo el TSHR se expresa basolateralmente al igual que NIS. El TSHR posee un motivo dileucina ácido, dos motivos basados en tirosina y un motivo PDZ tipo 1 ya caracterizado (283), y es junto con Duox2 la proteína que presenta mayor cantidad de motivos similares a los que presenta NIS. Sin embargo, Duox2 presenta una expresión apical a diferencia de NIS y TSHR. Estos resultados constituyen una primera aproximación al estudio de los motivos lineales de aminoácidos involucrados en el transporte intracelular de las proteínas de membrana que intervienen en la biosíntesis de hormonas tiroideas. Sin duda alguna, la relevancia de estos motivos en los procesos de transporte intracelular deberá ser evaluada en modelos *in vitro* de igual manera que se estudiaron los motivos de NIS.

Tabla 6. Motivos cortos de aminoácidos similares a los de NIS identificados en otras proteínas de la biosíntesis de hormonas tiroideas. Código de aminoácidos de una sola letra. X: cualquier aminoácido. Φ: aminoácido hidrofóbico. aa: aminoácidos.

	NIS		TSHR		TPO		DUOX2		DUOXA2		PDS	
	aa	posición	aa	posición	aa	posición	aa	posición	aa	posición	aa	posición
Triptofano ácido (L-X-W-D/E)	LWWD	563-566	-	-	-	-	LTWE	918-922	-	-	-	-
Tirosina ácido (D/E-Φ-Y-Φ-D/E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucina ácido (D/E-D/E-X-X-X-L(I/L/V))	EEVAIL	583-588	EDVVELI	735-741	-	-	EDKRSL DENGFL	856-862 869-875	-	-	EDIEDL	618-624
Basado en tirosina (Y-X-X-Φ)	YEYL	118-122	YITV YELI	604-608 738-742			YDLV YLSF YTEA YKRF YILL YVPF YVFA YLQF YHPF YPKL YFIW YENF	713-717 837-841 1010-1014 1030-1034 1095-1099 1116-1120 1202-1206 1285-1289 1314-1318 1357-1361 1414-1418 1544-1548			YSEL YKNI YGNV	26-30 535-539 555-559
PDZ tipo 1 (T/S-X-L)	ETNL		ETVL		-		-		TTNL		-	

5. Discusión

La incorporación de yoduro desde el torrente sanguíneo hacia el interior de la célula folicular tiroidea es mediada por NIS, que se localiza en la membrana basolateral de la célula folicular tiroidea. Mutaciones que afectan la capacidad de NIS de mediar el transporte de yoduro conllevan a un fenotipo particular de hipotiroidismo congénito dishormonogénico conocido como ITD. La identificación y posterior caracterización de mutaciones en NIS causales de ITD han conducido al entendimiento del plegamiento, transporte y funcionamiento del transportador (19). Además de su importante rol en la fisiología tiroidea, NIS constituye la piedra angular del tratamiento con yoduro radiactivo del carcinoma diferenciado de tiroides. La efectividad de la terapia con yoduro radioactivo depende directamente de la expresión funcional de NIS en la membrana plasmática de la célula tumoral tiroidea. Aunque frecuentemente los tumores tiroideos poseen una menor capacidad de transportar yoduro con respecto al tejido tiroideo normal, los tumores tiroideos diferenciados mantienen diferentes niveles de expresión de NIS comparados con el tejido normal adyacente (76,80,82,83,285,286). Sorprendentemente, la expresión de NIS en células tumorales es mayormente intracelular, lo cual sugiere anomalías en el transporte de la proteína a la membrana plasmática. Por lo tanto, desde un punto de vista terapéutico, profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan el transporte de NIS a la membrana plasmática debe ser una prioridad para mejorar la terapia con yoduro radioactivo. De hecho, el desarrollo de estrategias que restauren la deficiencia en el transporte, además de aumentar la expresión de NIS a nivel transcripcional, serían altamente deseables, ya que defectos en el transporte de NIS a la membrana plasmática juegan un rol central en la refractariedad al tratamiento con yoduro radioactivo. En esta línea de pensamiento, intervenciones terapéuticas que permitan aumentar la cantidad de moléculas de NIS que se localizan en la membrana plasmática de células tumorales mejoraría notablemente la eficacia del tratamiento con yoduro radioactivo, lo cual permitiría disminuir las dosis de tratamiento y por lo tanto minimizar los efectos secundarios del tratamiento (66). Sin embargo, actualmente el conocimiento acerca de los mecanismos que regulan la expresión de NIS en la membrana plasmática celular es limitado.

La hormona TSH constituye el principal regulador de la expresión de NIS en la célula folicular tiroidea, no solo estimulando su expresión a nivel transcripcional sino también a nivel post-transcripcional. La estimulación de las células foliculares tiroideas con TSH conlleva a la localización y mantenimiento de NIS en la membrana plasmática. Ante la deprivación hormonal, NIS se relocaliza hacia compartimentos intracelulares no caracterizados y el patrón de fosforilaciones se modifica (41). Sin embargo, ninguna fosforilación ha sido vinculada de forma directa al proceso de transporte intracelular de NIS (42).

Estudios previos de mutaciones identificadas en pacientes con ITD arrojaron cierta evidencia acerca de la relevancia de determinadas regiones aminoacídicas de NIS involucradas en el proceso de transporte intracelular (59,61,289). Particularmente, Pohlenz *et al.* (64) demostraron que la mutante S509RfsX6 (Y515X) NIS, identificada en un paciente con ITD, no es transportada a la membrana plasmática, y por lo tanto, no media la acumulación de yoduro. Estos resultados sugieren que la región carboxilo terminal contiene determinantes moleculares que intervienen en el transporte de la proteína a la membrana plasmática. Darrouzet *et al.* (65) realizaron un análisis sistemático de motivos cortos de aminoácidos de NIS que podrían estar involucrados en el transporte de la proteína hacia la membrana plasmática. Si bien los autores reportan que residuos del segundo segmento citosólico son importantes para el transporte de NIS a la membrana

plasmática, ningún motivo aminoacídico involucrado en el transporte intracelular de NIS fue identificado en el carboxilo terminal de la proteína.

En el presente trabajo de investigación hemos demostrado la relevancia del carboxilo terminal de NIS para la expresión del transportador en la membrana plasmática celular. Particularmente, la mutante de NIS que carece de la totalidad de la región carboxilo terminal (I546X NIS) es retenida en el RE de células no polarizadas y, por lo tanto, no media la captación de yoduro. El carboxilo terminal de NIS es la región citosólica más extensa de la proteína y sería una región desestructurada o de desorden intrínseco. Ambas características sugieren que el mismo podría ser blanco de modificaciones post-traduccionales como también podría poseer motivos lineales de aminoácidos que sean importantes para los procesos de transporte intracelular. Análisis *in silico* de alineamiento múltiple de secuencias y búsqueda de motivos cortos de aminoácidos en la región carboxilo terminal nos permitieron identificar zonas de alta conservación como también motivos aminoacídicos que podrían estar involucrados en los procesos de transporte intracelular. La región comprendida entre los residuos I546 y K618 es la que presenta el mayor grado de conservación entre especies y la mayor cantidad de motivos lineales de aminoácidos. Mediante un análisis preliminar en células MDCK-II expresando establemente diferentes mutantes diseñadas para interrumpir de forma independiente cada uno de los motivos lineales de aminoácidos que podrían ser de importancia en el transporte intracelular de NIS, pudimos identificar tres motivos aminoacídicos particulares que son importantes en el transporte intracelular de NIS hacia la membrana plasmática: un motivo triptofano ácido (comprendido por los aminoácidos 563-LWWD-566), un motivo monoleucina (comprendido por los residuos 578-EVAIL-583), y un motivo PDZ tipo 1 (conformado por los últimos tres aminoácidos del extremo carboxilo terminal, 641-TNL-643).

Además, identificamos nuevas mutantes de NIS en pacientes con hipotiroidismo congénito producto de defecto en la acumulación de yoduro sugerida por estudios bioquímicos e imagenológicos, destacándose en particular la identificación de tres nuevas mutaciones en el carboxilo terminal de la proteína que impiden su transporte a la membrana plasmática. Se identificaron un total de cinco mutantes: S547R, D331N, G561E, L562M y G543R, de las cuales S547R, G561E y L562M se localizan en el carboxilo terminal de NIS. La caracterización funcional de las diferentes mutaciones indicó defectos totales (G543R y S547R) o parciales (D331N, G561E y L562M) en el transporte de la proteína mutante a la membrana plasmática en células no polarizadas. La caracterización bioquímica de las mutantes S547R, G561E y L562M develó que las tres mutaciones afectan la expresión de NIS en la membrana plasmática, corroborando de esta manera la importancia de la región carboxilo terminal en el proceso de transporte intracelular de NIS. En particular, las mutaciones en las posiciones 561 y 562 se encuentran adyacentes al motivo triptofano ácido constituido por los residuos L563-D566. A su vez, los resultados dejan en evidencia la relevancia de dicho motivo triptofano ácido en el proceso de salida de la proteína del RE y transporte anterógrado hacia el complejo de Golgi, es decir en la primer etapa del proceso de transporte intracelular de la vía exocítica o secretoria. Por otra parte, pudimos identificar a la proteína KLC2 como la mediadora de este proceso. KLC2 reconoce el motivo triptofano ácido de NIS por medio de sus dominios TPR regulando la salida de NIS del RE. Sin embargo, no podemos descartar la participación de KLC2 en los procesos de transporte de NIS posteriores a Golgi debido a que, al tratarse de un proceso secuencial, la interrupción del motivo triptofano ácido o la depleción de KLC2 únicamente nos permitiría evidenciar la primer etapa en la cual se encuentran involucrados estos actores. La identificación del mencionado motivo nos brindó la posibilidad de dilucidar el mecanismo por el cual las mutaciones G561E y L562M causan una disminución en la funcionalidad de la proteína producto de su

retención parcial en el RE. Simulaciones computacionales y ensayos bioquímicos revelaron que la mutación G561E reduce la interacción NIS:KLC2 producto de una alteración en la estructura tridimensional de la secuencia del motivo triptófano ácido, resultando en la retención de la mutante G561E en el RE. Estos resultados permitirían explicar la deficiencia en la acumulación de yoduro en el paciente homocigota para la mutación G561E y, por ende, su defecto en la biosíntesis de hormonas tiroideas. En el caso de la mutante L562M NIS, experimentos de simulación computacional sugieren que el cambio de la leucina por una metionina produciría una estabilización del complejo NIS:KLC2, impidiendo el desarmado del complejo proteico al llegar al complejo de Golgi y la continuidad de su transporte a lo largo de la vía exocítica. Esto produciría una saturación del sistema de transporte mediado por KLC2 entre RE y Golgi y la consecuente acumulación de NIS en el RE. Además de la mutación L562M, el Paciente C presenta también la mutación G543R. Para que pacientes que presentan heterocigosis compuesta en el gen que codifica para NIS tengan un fenotipo de ITD, ambas mutaciones deben ser patogénicas, es decir producir una proteína que no pueda llevar adelante su actividad de forma correcta. En este caso en particular, se pudo concluir que tanto la mutante G543R NIS como la mutante L562M NIS son patogénicas. Estos resultados permitirían explicar el cuadro de hipotiroidismo congénito que presenta el Paciente B debido a deficiencia en el transporte de yoduro.

En estrecha relación, deficiencias en el transporte anterógrado debido a mutaciones en microtúbulos o motores moleculares asociados a microtúbulos, como las kinesinas, están asociadas con varias enfermedades, incluido el hipotiroidismo congénito (290). En particular mutaciones en el gen TUBB1, que codifica para una tubulina de la familia de las β -tubulina, han sido identificadas en familias con hipotiroidismo congénito. Este gen se expresa en el tejido tiroideo de humanos y ratones durante el desarrollo de la glándula y en el tejido adulto. Las mutaciones halladas en este gen impiden la incorporación de dímeros α/β -tubulina a los microtúbulos y han sido vinculadas directamente al incorrecto desarrollo de la glándula tiroidea y la incapacidad de secretar hormonas tiroideas (290). Sin embargo, poco se sabe sobre el papel de los complejos de proteínas motoras de kinesina en el transporte intracelular de proteínas en células tiroideas. D'Amico *et al.* (218) demostraron que el déficit de KIF3A produce hipotiroidismo leve como consecuencia de una señalización deficiente de TSH debido a defectos en el transporte del TSHR a la membrana plasmática, lo cual demuestra la relevancia de estos motores moleculares en la fisiología tiroidea. Sin embargo, el complejo motor constituido por KIF3A forma parte de una familia de kinesinas distinta a la de Kinesina-1 constituida por cadenas livianas (KLC) y cadenas pesadas (KHC). Es por esto que la identificación de KLC2 como una de las proteínas que asiste a NIS en su transporte intracelular constituye el primer reporte de la relevancia de los complejos motores Kinesina-1 en la fisiología tiroidea.

La identificación de KLC2 como una de las proteínas que asiste el transporte de NIS a la membrana plasmática nos condujo a pensar en la relevancia de dicha proteína en un contexto tumoral. La ausencia de KLC2 en la célula tumoral permitiría explicar, al menos en parte, la retención intracelular de NIS en ciertos tumores tiroideos. Es por ello que analizamos el nivel de expresión transcripcional de KLC2 en carcinomas papilares de tiroides por medio de los datos de RNA-seq depositados en la base de datos TCGA (72). Para nuestra sorpresa, la expresión de KLC2 a nivel transcripcional se encuentra aumentada en carcinomas papilares de tiroides. Estos resultados refutarían nuestra hipótesis acerca del silenciamiento de KLC2 en un contexto tumoral, aunque no podemos descartar que existan mecanismos a nivel post-transcripcional que regulen su expresión a nivel proteico. Además la gran plasticidad de los complejos motores dada por la presencia de diversas isoformas de

las subunidades que las componen (cuatro isoformas de KLC y tres de KHC) y los múltiples mecanismos de regulación de los mismos, abren nuevos interrogantes acerca de la regulación de los mecanismos de transporte mediados por estos complejos moleculares. En particular, la interacción de KLC con sus respectivos cargos puede verse regulada por diversos mecanismos, como empalme alternativo (215) y fosforilaciones (291–294). Respecto a la fosforilación de KLC se ha propuesto que las kinasas GSK3, ERK y CaMKII fosforilan esta clase de proteínas (291,293). En lo que respecta a tumores tiroideos, la vía de las MAPK se encuentra frecuentemente desregulada y por ende existiría la posibilidad de que KLC2 sea fosforilada por ERK o incluso por CaMKII. En este contexto, la interacción de KLC2 con sus respectivos cargos podría encontrarse alterada, lo cual permitiría explicar por ejemplo la retención intracelular de NIS en tumores tiroideos. Esto constituiría un mecanismo adicional de regulación negativa de la expresión funcional de NIS por la vía de las MAPK. Por otra parte, la regulación de la interacción de KLC con sus cargos por GSK3 parece poco probable en el contexto tumoral tiroideo dado que GSK3 es inactivada por ERK. Como se mencionó anteriormente, la especificidad de interacción de KLC con sus cargos se encuentra también regulada por corte y empalme alternativo. KLC1 y KLC2 presentan al menos dos isoformas debido a corte y empalme alternativo que interaccionan de forma diferencial con los cargos y con los dominios KHC (215,295). La desregulación de estos mecanismos se encuentra directamente relacionada con la progresión tumoral (296) y por lo tanto, podría alterar la interacción de KLC con sus cargos. Este modelo permitiría también explicar la retención intracelular de NIS debido a una alteración de la interacción con KLC2.

Si bien no se ha determinado la localización subcelular de NIS en la célula tumoral tiroidea, existe cierta evidencia que indicaría que NIS es principalmente retenido en el RE. El patrón electroforético de NIS en la línea celular K1 de carcinoma diferenciado de tiroides revela la presencia mayoritaria de la forma inmadura de NIS localizada en el RE (89). Por otra parte, ensayos de PLA en la línea celular TPC-1 de carcinoma diferenciado de tiroides revelaron que NIS se localiza mayoritariamente en RE y complejo de Golgi (90). Sin embargo, el patrón electroforético de NIS en estas células no es claro ya que los autores únicamente muestran la banda correspondiente a la proteína madura. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis acerca de la acumulación de NIS en el RE de células tumorales tiroideas debido a una pérdida de la interacción NIS:KLC2. Sería de particular interés y relevancia entender el rol de la proteína KLC2 en los procesos de transporte intracelular en un contexto tumoral y, particularmente, evaluar agonistas o moléculas estimuladoras de la actividad de esta proteína como posibles agentes terapéuticos que incrementen la expresión de NIS en la membrana plasmática y por ende la capacidad de acumular yoduro de las células tumorales tiroideas.

Cómo se indicó previamente, la célula folicular tiroidea forma un epitelio altamente polarizado que determina la orientación de los sistemas enzimáticos que intervienen en la biosíntesis de hormonas tiroideas. Particularmente, el transporte de yoduro ocurre a nivel de la membrana plasmática basolateral donde el yoduro presente en el torrente sanguíneo es transportado eficientemente por NIS hacia el interior celular. Por lo tanto, la secuencia de NIS habría de contener señales aminoacídicas reconocidas por la maquinaria de transporte intracelular que determinen su localización en la membrana plasmática basolateral. En este trabajo de investigación identificamos un motivo monoleucina altamente conservado en mamíferos (E578-L583) determinante para el transporte basolateral de NIS en monocapas de células epiteliales polarizadas. Es importante destacar que las secuencias de NIS de otros filos no presentan un motivo monoleucina en el carboxilo terminal como el encontrado en mamíferos, pero si presentan motivos dileucina o motivos basados en tirosinas que también pueden intervenir en los procesos de transporte polarizado. En coincidencia con

nuestros resultados, la mutante de NIS de rata careciendo de los últimos 43 aminoácidos del carboxilo terminal (T575X rNIS) se expresa exclusivamente en la membrana apical de células MDCK-II polarizadas (15). Esta observación sugiere que la región entre los aminoácidos T575 y L618 del carboxilo terminal de NIS de rata contiene señales que determinan la expresión basolateral de la proteína. De hecho, la mutante T575X rNIS disrumpe el motivo monoleucina localizado entre los residuos E573 y L578 que determina el transporte de NIS a la membrana basolateral. Adicionalmente, dilucidamos el rol de la proteína adaptadora AP1B en el reconocimiento del motivo monoleucina y el direccionamiento de NIS hacia la membrana basolateral. Tomados en su conjunto, nuestros resultados sugieren que el adaptador AP1B participa en el reconocimiento del motivo monoleucina de NIS y su posterior transporte desde TGN o la vía endosomal hacia la membrana plasmática basolateral. Una pregunta que se abre ante la identificación de este motivo monoleucina ácido en el proceso de transporte de NIS hacia la membrana plasmática, es si este mismo motivo se encuentra vinculado también a los procesos de endocitosis de NIS, como ha sido reportado para esta clase de motivos (146). Estudios futuros permitirán dilucidar si dicho motivo monoleucina se encuentra vinculado a los procesos de endocitosis de NIS o si se trata de otra clase de motivos de aminoácidos.

Aunque inicialmente NIS fue considerado una proteína específica de la glándula tiroides, su expresión funcional ha sido reportada en otros tejidos (glándulas salivales, estómago, intestino delgado, glándula mamaria lactante, riñones, placenta y ovario) (297). Considerando las diferentes necesidades tejido-específicas de yoduro, la expresión de NIS presenta diferentes patrones de localización basolateral-apical. Por lo tanto, otros factores aún no caracterizados, como modificaciones post-traduccionales o la expresión tejido específica de proteínas adaptadoras, deben regular el transporte de NIS a la membrana plasmática. Significativamente, la ausencia del adaptador epitelio específico AP1B en el túbulo contorneado proximal determina que muchas proteínas de expresión basolateral en diversos tejidos se expresen apicalmente en el túbulo contorneado proximal del riñón, optimizando de esta manera la reabsorción de nutrientes (298). Nuestros resultados indican que la disrupción del motivo monoleucina de NIS produce la incorrecta localización de la proteína en la membrana apical en células polarizadas que expresan la proteína adaptadora AP1B, indicando que este motivo constituye una señal de transporte exclusivamente basolateral. Además, NIS contiene determinantes recesivos de localización apical, aún no identificados, que se encuentran enmascarados por la dominancia del motivo monoleucina. Actualmente, una de las preguntas abiertas acerca del transporte de NIS a la membrana plasmática reside en la expresión de NIS en la membrana apical de las microvellosidades de enterocitos absortivos del intestino delgado (299). En consecuencia, las mutantes de NIS carentes del motivo monoleucina constituirían el punto de partida para el estudio de señales recesivas de direccionamiento apical.

Por otra parte, mientras que la polaridad celular es crucial en la síntesis de hormonas tiroideas, los tumores tiroideos sufren una pérdida de polarización durante la transición epitelio-mesénquima (300). En células no polarizadas, como fibroblastos, el transporte de proteínas de membrana requiere señales aminoácidas de transporte para completar su recorrido desde TGN hasta la membrana plasmática (301). De hecho, la mutante I582A/L583A NIS, cuyo motivo monoleucina ha sido interrumpido, es mayormente retenida intracelularmente luego de su salida de Golgi en células MDCK-II no polarizadas. Por ende, motivos aminoácidos involucrados en los procesos de transporte basolateral de proteínas en células polarizadas podrían también afectar la expresión en la membrana plasmática en células no polarizadas. En esta línea de pensamiento, la identificación de los mecanismos involucrados en el transporte basolateral de NIS podrían estar vinculados con la retención intracelular de la proteína en tumores tiroideos. Por este motivo se analizó la expresión del gen AP1M2, que

codifica para la subunidad μ 1B, en carcinomas foliculares tiroideos, al igual que lo realizamos para KLC2. La expresión transcripcional de AP1M2 se encuentra aumentada de forma significativa en carcinomas tiroideos en comparación con el tejido normal, lo cual *a priori* no explicaría la retención intracelular de NIS en tumores tiroideos, aunque como se mencionó anteriormente, no podemos descartar mecanismos post-transcripcionales que regulen la expresión de la proteína. Por otra parte, la estabilidad, conformación y capacidad de interacción de los complejos adaptadores involucrados en el transporte basolateral y la endocitosis de proteínas se encuentran altamente reguladas por fosforilaciones. La kinasa asociada a AP2 (AAK1) y la ciclina GAK han sido propuestas como las enzimas que median la fosforilación de la subunidad μ de las APs (302,303). A pesar de estos reportes, la relevancia fisiológica de la fosforilación de los complejos adaptadores continúa sin ser dilucidada (304). Por otra parte, los complejos APs se encuentran formados por cuatro subunidades de las cuales existen varias isoformas. La capacidad de interacción y ensamblado así como la regulación de estas diferentes isoformas de las subunidades es sumamente amplia, lo cual aumenta notablemente la complejidad de la regulación y funcionalidad de las APs (171). Trabajos futuros permitirán determinar si la interacción del motivo monoleucina con el complejo AP1B se encuentra desregulada en el cáncer de tiroides y si esto tiene algún impacto en la expresión de NIS en membrana plasmática.

La localización subcelular de una dada proteína no se encuentra únicamente determinada por aquellos motivos aminoacídicos que dirigen a la proteína en el proceso de transporte intracelular sino también por motivos de aminoácidos que permiten la estabilización de la proteína en un compartimento celular determinado. En particular, los motivos PDZ han sido extensamente caracterizados en los procesos de transporte intracelular y de estabilización y/o retención de proteínas de membrana en determinados compartimentos celulares (222,224). En el presente trabajo de tesis hemos identificado un motivo PDZ tipo 1 en el extremo carboxilo terminal de NIS constituido por los últimos tres aminoácidos de la proteína (641-TNL-643). Los resultados indican que este motivo estabiliza la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral en células polarizadas, retrasando su internalización y posterior degradación por vía lisosomal. Recientemente, Makretskaya *et al.* (50) realizaron un análisis de mutaciones mediante la secuenciación de un panel de 12 genes asociados a la enfermedad en 243 pacientes con hipotiroidismo congénito, identificando 2 nuevas mutaciones en NIS: N157Tfs159X y R636X. Aunque los autores no caracterizaron a nivel bioquímico ninguna de estas mutaciones, podemos deducir que la mutación N157Tfs159X, debida a la delección de una base produce un corrimiento del marco de lectura que conlleva a un cambio aminoacídico de asparragina a treonina en la posición 157 con la concomitante aparición de un codón STOP en la posición 159, producirá una proteína trunca que carece del 75% del péptido que compone la proteína funcional y por ende esta proteína aberrante sería retenida en el RE o su transcripto será degradado mediante mecanismos de degradación del ARNm mediada por mutación terminadora, inhibiéndose directamente la síntesis de la proteína aberrante. En cuanto a la mutación R636X NIS genera una versión trunca de NIS que únicamente carece de los últimos siete aminoácidos que componen la proteína. Coincidentemente, dentro de estos siete aminoácidos del carboxilo terminal se encuentra comprendido el motivo PDZ tipo 1 caracterizado en el presente trabajo de tesis doctoral. Como se mencionó anteriormente, este motivo PDZ es importante para la estabilización de NIS en la membrana plasmática basolateral, aunque su carencia no suprime la expresión de la proteína en la membrana plasmática. De hecho, células MDCK-II expresando establemente la mutante de NIS carente del motivo PDZ acumulan niveles reducidos, aunque detectables, de yoduro. La mutación R636X NIS produciría un efecto similar al descrito para la mutante T641X NIS, lo cual indicaría que los pacientes que acarrean dicha mutación

conservarían cierta capacidad de acumular yoduro que sostendría la biosíntesis de hormonas tiroideas. Sin embargo, los pacientes portadores de la mutación R636X NIS muestran una glándula tiroidea hipoplásica de causas desconocidas. El efecto de la disminución en el tamaño de la glándula tiroidea conjuntamente con una mutante de NIS de actividad reducida permitiría explicar el cuadro de hipotiroidismo congénito producto de un defecto en la acumulación de yoduro presentado por estos pacientes.

El motivo PDZ tipo 1 es reconocido por diversas proteínas con dominios PDZ, entre las cuales se destaca la proteína polar SCRIB. SCRIB ya ha sido reportada como una proteína de relevancia para la estabilización del TSHR en la membrana plasmática basolateral (231). Como se mencionó anteriormente, la remoción del motivo PDZ carboxilo terminal conduce a la localización de NIS en cuerpos vesiculares intracelulares que co-localizan con marcadores de endosomas tardíos y lisosomas. Es decir que la interacción de NIS con SCRIB, mediada por el reconocimiento del motivo PDZ, estabilizaría la expresión del transportador en la membrana plasmática evitando su internalización y posterior degradación por la vía lisosomal. Los mecanismos por medio de los cuales SCRIB modula la internalización de NIS aún no son conocidos. Una posibilidad es que SCRIB enmascare señales de internalización de NIS por medio del ensamblado de complejos multiproteicos en la membrana plasmática.

Mediante la implementación de la técnica de CRISPR/Cas9 generamos dos clones de células MDCK-II deficientes para la expresión de SCRIB. Al observar mediante microscopía de fluorescencia la localización subcelular de NIS en células MDCK-II deficientes en SCRIB, encontramos que NIS se localiza principalmente en la membrana plasmática de estas células no polarizadas. Sin embargo, al realizar el análisis en estas mismas células pero formando una monocapa epitelial polarizada evidenciamos que NIS se localiza en compartimentos vesiculares intracelulares, es decir un patrón similar al que presenta la mutante de T641X NIS en células MDCK-II polarizadas. Estas discrepancias en el patrón de localización de NIS entre células deficientes en SCRIB no polarizadas y polarizadas es llamativo en principio, pero podría explicarse debido a la interacción de NIS con otras proteínas con dominio PDZ que luego del proceso de polarización celular cambien su expresión o localización basolateral-apical. De hecho, además de SCRIB, es posible que otras proteínas con dominios PDZ estén involucradas en los procesos de transporte de NIS a la membrana plasmática. Teniendo en cuenta que el PDZ Domain Array permitió la detección de diversas proteínas capaces de interactuar con el carboxilo terminal de NIS, es importante considerar que otras proteínas con dominios PDZ interactúen con NIS regulando su localización. Avalando esta idea, se detectaron proteínas de expresión apical (como NHERF1 y 2) que podrían reconocer el motivo PDZ de NIS a nivel celular regulando su localización subcelular, lo cual podría explicar, por ejemplo, la expresión apical de NIS en las microvellosidades de enterocitos intestinales o en el túbulo contorneado proximal. El estudio de la retención en la membrana plasmática apical de la mutante de NIS que carece del motivo monoleucina constituiría un buen punto de partida para el análisis de la relevancia de la interacción de NIS con otras proteínas con dominios PDZ en la membrana apical.

La diferencia en la expresión de NIS en la membrana plasmática de células MDCK-II SCRIB KO según las condiciones de polarización celular abre un interrogante acerca de la distribución diferencial de proteínas durante los procesos de polarización celular y cómo esto repercute en la localización subcelular de NIS. En células MDCK-II SCRIB KO no polarizadas, NIS se localiza en la membrana plasmática, mientras que cuando estas mismas células forman una monocapa epitelial polarizada NIS se localiza en compartimentos vesiculares intracelulares. Durante la polarización celular se produce la diferenciación de la membrana plasmática en un

compartimento apical y uno basolateral. Consecuentemente se produce un transporte polarizado de proteínas y lípidos hacia los dos compartimentos de membrana plasmática que en células no polarizadas no existen. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que NIS sea capaz de interactuar con múltiples proteínas con dominios PDZ que presentan expresión diferencial en epitelios polarizados pero no así en células no polarizadas. De esta manera una proteína que se expresa apicalmente en un epitelio polarizado, podría interactuar con NIS en la membrana plasmática de células no polarizadas pero no en un modelo polarizado de células MDCK-II. Esto podría explicar el patrón diferencial de expresión de NIS en células depletadas de SCRIB en condiciones no polarizadas y polarizadas.

Por otra parte, no podemos descartar que la localización aberrante de NIS en células MDCK-II SCRIB KO polarizadas se deba exclusivamente a la pérdida de la interacción NIS:SCRIB en la membrana plasmática basolateral. Tanto en *Drosophila melanogaster* como en células de mamíferos, SCRIB actúa como un supresor tumoral y su pérdida coopera con la señalización oncogénica mediada por Ras en la transformación celular (232,305–308). El módulo de polaridad celular Scribble estabiliza la interacción de E-caderina y p120-Catenina en las zonas adherentes (309), manteniendo la polaridad epitelial e inhibiendo la transición epitelio-mesénquima. Cabe la posibilidad de que la localización de NIS en cuerpos vesiculares intracelulares observada en células MDCK-II SCRIB KO se deba a estos problemas de polarización y arquitectura celular y no a la pérdida de la interacción NIS:SCRIB.

La pérdida de la expresión de SCRIB ha sido reportada en cáncer de mama, uterino, colorectal y de próstata, y está asociada con una pérdida de la polaridad celular y una arquitectura celular desorganizada, incluyendo una localización subcelular aberrante de E-caderina (310–313). La deslocalización de SCRIB promueve la tumorigenesis en mama e impide la morfogénesis polarizada y falla en la inhibición de la invasión mediada por Ras en células epiteliales normales de mama (306,314,315). En severo contraste con el mencionado rol de SCRIB como supresor tumoral, la asociación de SCRIB con el complejo NOS1AP-VANGL en lamelipodios de células tumorales de cáncer de mama ha sido correlacionada con un aumento de la migración y progresión tumoral (316). Por otra parte, SCRIB interactúa con las quinasas ERK y PKA regulando su funcionalidad y localización, y viceversa (317,318). El análisis de la expresión transcripcional de SCRIB develó niveles mayores de transcripto en carcinomas papilares de tiroides en comparación con el tejido normal. *A priori*, este hallazgo impediría explicar la retención intracelular de NIS en este tipo de tumores debido a una baja en la interacción de SCRIB y NIS en la membrana plasmática. Sin embargo, como se discutió anteriormente, existen mecanismos post-transcripcionales que regulan la expresión proteica y modificaciones post-traduccionales que juegan un rol central en las interacciones entre proteínas. Al respecto, se ha reportado que fosforilaciones en motivos PDZ, como también en dominios PDZ, modulan la interacción proteína-proteína, llevando a la pérdida o ganancia de interacción (319). Sin embargo, no se han reportado fosforilaciones de NIS en el residuo treonina que forma parte del motivo PDZ (42). Además, S-palmitoilaciones regulan la localización subcelular de SCRIB y por ende sus interacciones (320,321). De hecho, la única forma de que SCRIB pueda anclarse a la membrana plasmática es mediante s-palmitoilaciones en su dominio LRR, ya que esta proteína carece de regiones transmembrana. La desregulación del equilibrio de SCRIB palmitoilado o despalmilado depende del balance en la actividad de proteínas acetilasas (PATs) y deacetilasas (APTs) (320–323), como también de la disponibilidad del lípido. Se han identificado 17 isoformas de PATs y tan solo 2 de APTs, de las cuales solo la isoforma 2 (APT2) es la encargada de remover la palmitoilación en SCRIB (320,322). El análisis de los datos de

TCGA reveló que la enzima APT2 se encuentra sobreexpresada a nivel transcripcional en PTC. Esto podría indicar un desplazamiento de las formas de SCRIB palmitoiladas hacia las formas despalmiladas y por ende a una deslocalización de SCRIB de la membrana plasmática. Consecuentemente, SCRIB no podría estabilizar a NIS en la membrana plasmática, conduciendo a su internalización y posterior degradación por la vía lisosomal. Este modelo permitiría explicar la refractariedad al tratamiento con yodo radioactivo que presentan algunos tumores tiroideos que, a pesar de expresar NIS, son incapaces de incorporar el radionucleído en cantidades suficientes como para producir la muerte celular. Si bien este modelo debe ser corroborado experimentalmente, su estudio podría permitir el desarrollo de nuevas terapias que mejoren el tratamiento de carcinomas tiroideos refractarios a la terapia con yodo radiactivo.

Dada la relevancia del carboxilo terminal de NIS en su transporte a la membrana plasmática, consideramos de alta relevancia clínica continuar con la investigación de proteínas que interactúan con esta región de la proteína y modulen su transporte a la membrana plasmática, tanto en condiciones fisiológicas como en carcinomas tiroideos. La transformación oncogénica inducida por BRAF^{V600E} reprimiría la expresión de proteínas involucradas en el transporte de NIS a la membrana plasmática o, alternativamente, induciría la expresión de proteínas que remuevan a NIS de la superficie celular, produciéndose así su retención intracelular (85). Particularmente, una de las proteínas reportada que interactúa con NIS y podría estar involucrada en el transporte deficiente de la proteína a la membrana plasmática en cáncer de tiroides es el factor de interacción con el gen transformante de tumores pituitarios (PBF). La sobreexpresión ectópica de PBF resulta en una reducción de la capacidad de acumular yodo debido a una redistribución de NIS desde la membrana plasmática hacia endosomas tardíos recubiertos de clatrina CD63 positivos (86). Dicha interacción se encuentra regulada por la fosforilación de la tirosina 174 de PBF mediada por la tirosina quinasa Src. La inhibición de la actividad quinasa de Src disrumpe la interacción NIS:PBF y restablece la expresión de NIS en la membrana plasmática (324).

Recientemente, Amit *et al.* (89) reportaron un posible vínculo entre la disminución en la expresión de la subunidad PIGU del complejo transamidasa glicosilfosfatidilinositol (GPI), que cataliza la adhesión de GPI a proteínas en el RE en carcinoma de tiroides y la retención de NIS en el RE. La sobre-expresión de dicha subunidad en un modelo de carcinoma de tiroides reestableció la expresión de NIS en la superficie celular. Sin embargo, considerando que NIS carece de sitios consenso para modificaciones post-traduccionales por GPI, el defecto del complejo transamidasa GPI no actuaría directamente sobre NIS sino sobre otra proteína, aún no identificada, y necesaria para la salida de NIS del RE (89).

Fletcher *et al.* (90) reportaron recientemente la relevancia de las proteínas ARF4 y VCP en los procesos de transporte intracelular de NIS. La proteína ARF4 intervendría de forma activa en el transporte de NIS desde TGN hacia la membrana plasmática al interactuar con el motivo VAPK (V574-K577) del carboxilo terminal de NIS, adyacente al motivo monoleucina identificado en este trabajo. ARF4 posee múltiples funciones a nivel celular, desde el reclutamiento de proteínas adaptadoras que median el transporte de proteínas hacia la membrana plasmática, hasta el reclutamiento de proteínas involucradas en el reciclado desde la membrana plasmática hacia la vía endosomal (325). En este punto sería interesante profundizar en la interacción funcional entre ARF4 y AP1 (326,327), que podría regular los procesos de transporte de NIS a la membrana plasmática. Además, los autores indican que la expresión transcripcional de ARF4 se encuentra reducida en PTC lo cual permitiría explicar, al menos parcialmente, la retención intracelular de NIS en ciertos tumores tiroideos.

Desafortunadamente no existen al día de la fecha moléculas agonistas o que estimulen la actividad de ARF4 y que podrían permitir un aumento de la expresión de NIS en la membrana plasmática. En severo contraste a la acción de ARF4, la acción de la proteína VCP conduciría a una disminución de la expresión de NIS en la membrana plasmática, a través de la vía de degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico (ERAD por sus siglas en inglés). La expresión de VCP se encuentra aumentada en PTC lo cual permitiría explicar la disminución de la expresión de NIS en la membrana plasmática en ciertos tumores tiroideos. Además, los autores evalúan la capacidad de aumentar la acumulación de yoduro por medio de inhibidores de VCP, obteniendo un incremento de la acumulación de yoduro al utilizar cinco inhibidores distintos. Se destacan en particular tres de estos cinco inhibidores (ebastina, astemizol y clotrimazol), los cuales se encuentran aprobados por la administración de drogas y alimentos de EE.UU. y han sido reposicionados como inhibidores de VCP recientemente, dado que se utilizaban previamente como antihistamínicos y antimicóticos, respectivamente. Particularmente, los autores evidencian un aumento en la capacidad de acumular yoduro de tirocitos de ratón expuestos a ebastina y clotrimazol, resultados que podrían conducir al desarrollo de nuevas terapias para tumores refractarios al tratamiento con yoduro radioactivo.

Por otra parte, los tumores de mama presentan expresión funcional de NIS en un 80% de los casos y son capaces de acumular yoduro (96,328). Sin embargo, al igual que ocurre en un gran porcentaje de tumores tiroideos, NIS se localiza principalmente de forma intracelular, lo cual limita su utilidad clínica para el tratamiento con yoduro radioactivo del cáncer de mama (96,329). Esta evidencia intensifica la importancia del estudio de los mecanismos que regulan la expresión de NIS en la membrana plasmática.

Recientemente, Thompson *et al.* (330) reportaron el rol de la dimerización de NIS en los procesos de transporte de esta proteína a la membrana plasmática. Sin embargo, existen varios puntos discutibles en este trabajo. En primer lugar, los autores identifican tres posibles residuos (Y242, T243 y Q471) involucrados en el mecanismo de dimerización basándose en la estructura tridimensional de NIS modelada de forma similar a la realizada en este trabajo de tesis, es decir, utilizando como templatado la estructura tridimensional dimerica del co-transportador de sodio/galactosa de *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT). Sin embargo, en el desarrollo del trabajo no se realiza una dinámica molecular del dímero para evaluar el comportamiento de los residuos supuestamente involucrados en el proceso de dimerización. Es importante tener en cuenta que los autores reportan principalmente residuos de las regiones extracelulares y algunos del carboxilo terminal, regiones de amplia movilidad y desestructuración por lo cual es de esperarse que estas regiones presenten alta movilidad en una dinámica molecular. Por otra parte, al mutar estos residuos los autores observan la retención de la proteína en el RE pero no pueden justificar que esta retención se deba a interrupciones en los procesos de dimerización o que se deba a defectos en el plegamiento de la proteína. Los autores tampoco pueden explicar en qué momento ocurre dicho proceso de dimerización, si ocurre tempranamente en la vía exocítica o si ocurre en los procesos de endocitosis, lo cual abre nuevos cuestionamientos y preguntas sobre el rol de la dimerización de NIS en los procesos de transporte intracelular. Posiblemente, la oligomerización de NIS sea un hecho en los procesos de biología celular, aunque hay que ser cautelosos al momento de vincular este proceso biofísico a un proceso celular en forma directa.

Mucho se ha discutido también acerca de la relevancia de las N-glicosilaciones de NIS en los procesos de transporte intracelular de esta proteína. Tanto Chung *et al.* (331) como Rathod *et al.* (332) reportaron la importancia de las N-glicosilaciones en la expresión de NIS en la membrana plasmática. Es importante recordar

que las N-glicosilaciones son en primer lugar el sustrato de la maquinaria de control de plegamiento del RE y por lo tanto defectos en las mismas podrían evidenciar problemas de plegamiento que conduzcan a la retención de la proteína en el RE. En ambos casos, los autores evalúan la relevancia de las N-glicosilaciones de NIS utilizando inhibidores químicos de la glicosilación como la tunicamicina y swainsinoína o silenciando la expresión de enzimas involucradas en estos procesos. La utilización de inhibidores no solo afecta la glicosilación de NIS sino también de todas las proteínas N-glicosiladas y puedan estar involucradas en los procesos de transporte intracelular de NIS. Además, si bien estos inhibidores alteran la funcionalidad de las enzimas involucradas en la glicosilación de proteínas, también pueden inhibir otros procesos como es el caso de la tunicamicina que es capaz de inhibir la palmitoilación (333). Por otra parte, Levy *et al.* (12) y Li *et al.* (14) realizaron mutaciones en los tres residuos asparraginas de NIS que se encuentran glicosilados cambiándolos por glutaminas, impidiendo de esta manera la glicosilación de NIS. Al evaluar la expresión en la membrana plasmática de la proteína mutante que presenta mutados los tres sitios de N-glicosilación, los autores reportan que la proteína se localiza en la membrana plasmática (12,14) y además conserva su capacidad de transportar yoduro (12), por lo cual descartan que las N-glicosilaciones sean importantes para el transporte de NIS a la membrana plasmática. Hay que tener en cuenta que estos experimentos fueron realizados en células Cos-7, que no expresan NIS de forma endógena, transfectadas con plásmidos de expresión para las mutantes de NIS bajo un promotor de expresión fuerte, es decir, que las mutantes de NIS estarían siendo sobreexpresadas en este sistema, posiblemente saturando los sistemas de transporte intracelular anterógrado, lo cual podría dificultar en algún punto la interpretación de los resultados. Sin duda alguna, las glicosilaciones de NIS juegan un rol importante en la fisiología de la proteína pero al día de la fecha no se tiene la certeza de la relevancia de estas modificaciones post-traduccionales en los procesos de transporte intracelular de NIS.

En conclusión, la presente tesis constituye el primer trabajo acerca de los mecanismos moleculares que subyacen el transporte de NIS a la membrana plasmática en condiciones fisiológicas. Aún queda mucho terreno por explorar en lo que respecta al transporte intracelular de NIS y aunque el mecanismo molecular que determina la retención intracelular de esta proteína en el cáncer de tiroides continúa sin ser comprendido en su totalidad, nuestros hallazgos acerca de la importancia del carboxilo terminal de NIS y las proteínas adaptadores KLC2, AP1B y SCRIB, para la expresión en la membrana plasmática de la proteína, podrían ser importantes en la identificación de nuevos blancos moleculares que mejoren el tratamiento con yoduro radioactivo de tumores tiroideos (334), particularmente aquellos que muestran expresión de NIS en compartimentos intracelulares.

6. Conclusiones

En resumen, el presente trabajo de tesis doctoral permitió arribar a las siguientes conclusiones respecto a los mecanismos moleculares involucrados en la expresión de NIS en la membrana plasmática en condiciones fisiológicas:

- I. La región carboxilo terminal es clave en el proceso de transporte a la membrana plasmática. Particularmente, la región comprendida entre los residuos I546 y K618 es importante en los procesos de transporte intracelular de NIS, mientras que la región comprendida entre los residuos K618 y Q639 parece no ser relevante en este proceso.
- II. El motivo triptofano ácido (563-LWWD-566) se encuentra altamente conservado y es reconocido por la proteína KLC2 que media la salida de NIS del RE con dirección al complejo de Golgi. Alteraciones en el reconocimiento del motivo triptofano ácido producto de mutaciones en residuos adyacentes conducen a cuadros patológicos con un fenotipo de deficiencia en el transporte de yoduro.
- III. El motivo monoleucina (578-EEVAIL-583) se encuentra altamente conservado, media el transporte de NIS desde el trans-Golgi hacia la membrana plasmática y es necesario para la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral en células polarizadas. El complejo proteico AP1B reconocería el motivo monoleucina mediando la expresión basolateral de NIS.
- IV. El motivo PDZ tipo 1, constituido por los últimos tres aminoácidos del carboxilo terminal de NIS, es importante para la expresión de NIS en la membrana plasmática retardando su internalización y posterior degradación por vía lisosomal. La proteína polar SCRIB reconoce el motivo PDZ y estabiliza la expresión de NIS en la membrana plasmática basolateral.

A modo de resumen gráfico, el modelo de transporte intracelular de NIS en un contexto fisiológico se encuentra representado en la **Figura 25**. Desregulaciones en cualquiera de las etapas de transporte de NIS a lo largo de la vía exocítica conduciría a defectos en la expresión del transportador en la membrana plasmática.

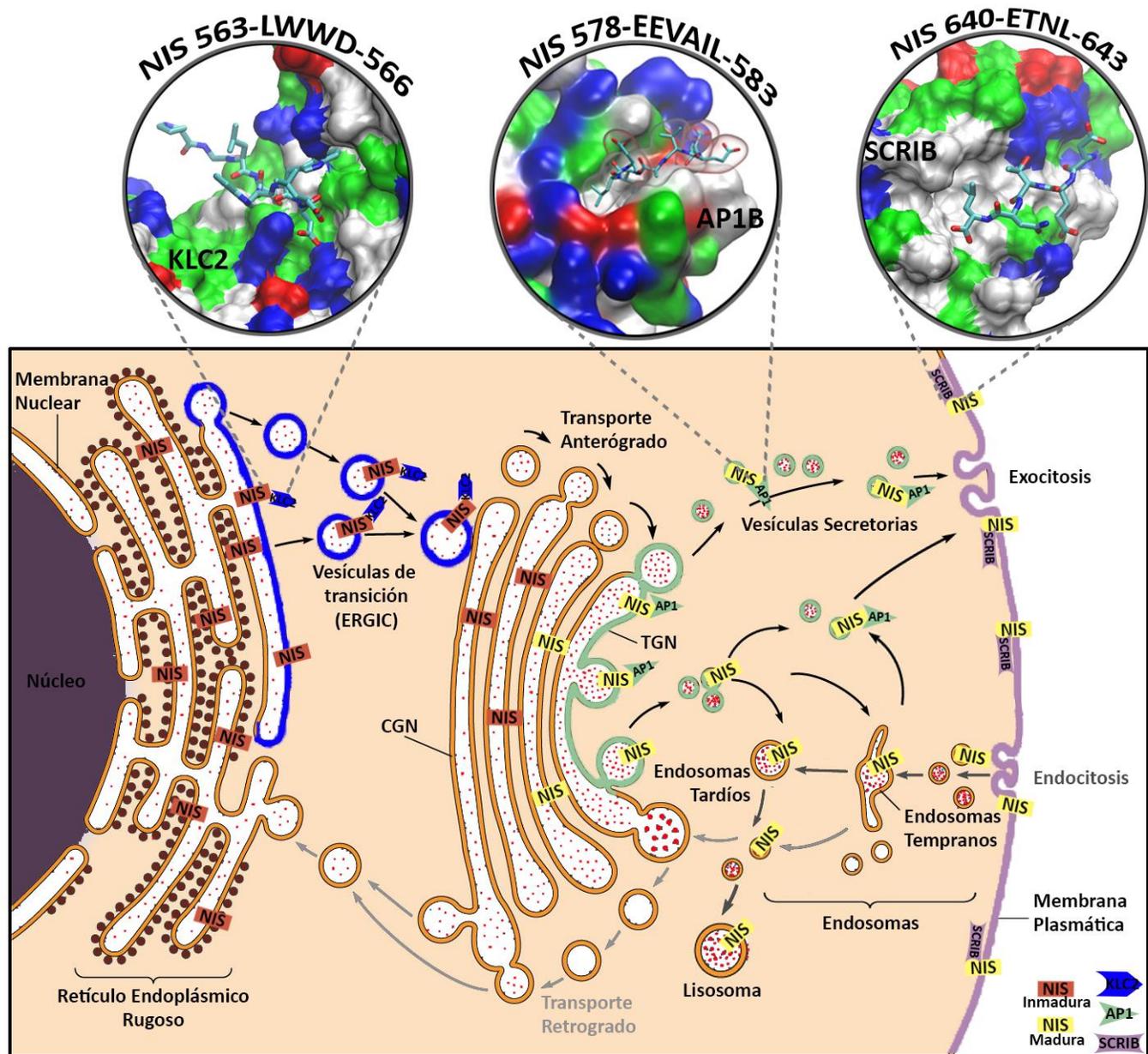


Figura 25. Resumen gráfico del proceso de transporte intracelular y expresión de NIS en la membrana plasmática. La región azul del RE y ERGIC constituye la región de interacción de NIS con KLC2. La región verde del TGN y vesículas secretorias constituye la región de interacción de NIS con AP1B. La región violeta de la membrana plasmática constituye la región de interacción de NIS con SCRIB. La forma de NIS inmadura se representa en color naranja oscuro y la forma de NIS madura de color amarillo. En la parte superior se encuentra el detalle atómico molecular de la interacción de cada uno de los motivos de NIS con sus respectivas proteínas interactoras.

7. Bibliografía

1. **Al-Gahtany M, Al-Sharaim M, Kovacs K.** Anatomy and Pathology of the Thyrotrophs. In: *Werner & Ingbar's The Thyroid a Fundamental and Clinical Text*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. **Dunn JT, Dunn AD.** Update on Intrathyroidal Iodine Metabolism. *Thyroid* 2001;11(5):407–414.
3. **Carrasco N.** Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1993;1154(1):65–82.
4. **Kopp P.** Thyroid Hormone Biosynthesis. In: *Werner & Ingbar's The Thyroid a Fundamental and Clinical Text*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
5. **Niepomnische H.** Future Meetings. *Thyroid* 2006;16(12):1329–1329.
6. **Larsen R, Davies T, Schlumberger M, Hay I.** Iodine and the Synthesis and Secretion of Thyroid Hormones. In: *Williams Textbook of Endocrinology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2008.
7. **Nicola JP, Basquin C, Portulano C, Reyna-Neyra A, Paroder M, Carrasco N.** The Na⁺/I⁻ symporter mediates active iodide uptake in the intestine. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009;296(4):C654–C662.
8. **Nicola JP, Carrasco N, Mario Amzel L.** Physiological sodium concentrations enhance the iodide affinity of the Na⁺/I⁻ symporter. *Nat. Commun.* 2014;5(1):3948.
9. **Dai G, Levy O, Carrasco N.** Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379(6564):458–460.
10. **Martín M, Nicola JP.** Congenital Iodide Transport Defect: Recent Advances and Future perspectives. *J. Clin. Mol. Endocrinol.* 2016;1(3):1–4.
11. **Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N.** Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997;94(11):5568–5573.
12. **Levy O, Vieja A De, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N.** N-linked Glycosylation of the Thyroid Na⁺ / I⁻ Symporter (NIS). *J. Biol. Chem.* 1998;273(35):22657–22663.
13. **Nicola JP, Peyret V, Nazar M, Romero JM, Lucero AM, Montesinos M del M, Bocco JL, Pellizas CG, Masini-Repiso AM.** S-Nitrosylation of NF-κB p65 Inhibits TSH-Induced Na⁺ / I⁻ Symporter Expression. *Endocrinology* 2015;156(12):4741–4754.
14. **Li W, Nicola JP, Amzel LM, Carrasco N.** Asn441 plays a key role in folding and function of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS). *FASEB J.* 2013;27(8):3229–3238.
15. **Dohan O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N.** The Na⁺/I⁻ symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(51):20250–20255.
16. **Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N.** Thyroid Na⁺ / I⁻ Symporter. *J. Biol. Chem.* 1997;272(43):27230–27238.
17. **Franken PR, Guglielmi J, Vanhove C, Koulibaly M, Defrise M, Darcourt J, Pourcher T.** Distribution and dynamics of (99m)Tc-pertechnetate uptake in the thyroid and other organs assessed by single-photon emission computed tomography in living mice. *Thyroid* 2010;20(5):519–26.
18. **Hilditch TE; Horton PW; McCrudden DC; Young RE; Alexander WD.** Defects in intrathyroid binding of iodine and the perchlorate discharge test. *Acta Endocrinol* 1982. doi:100:237-244.
19. **Ravera S, Reyna-Neyra A, Ferrandino G, Amzel LM, Carrasco N.** The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Molecular

- Physiology and Preclinical and Clinical Applications. *Annu. Rev. Physiol.* 2017;79(1):261–289.
20. **Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N.** The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance. *Endocr. Rev.* 2003;24(1):48–77.
 21. **Wapnir IL, Goris M, Yudd A, Dohan O, Adelman D, Nowels K, Carrasco N.** The Na⁺/I⁻ Symporter Mediates Iodide Uptake in Breast Cancer Metastases and Can Be Selectively Down-Regulated in the Thyroid. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(13):4294–4302.
 22. **Burrow GN, Fisher DA, Larsen PR.** Maternal and Fetal Thyroid Function. *N. Engl. J. Med.* 1994;331(16):1072–1078.
 23. **Weaver JC.** EXCRETION OF RADIOIODINE IN HUMAN MILK. *J. Am. Med. Assoc.* 1960;173(8):872.
 24. **Mizokami T, Fukata S, Hishinuma A, Kogai T, Hamada K, Maruta T, Higashi K, Tajiri J.** Iodide Transport Defect and Breast Milk Iodine. *Eur. Thyroid J.* 2016;5(2):145–148.
 25. **Venturi S, Venturi M.** Iodine in Evolution of Salivary Glands and in Oral Health. *Nutr. Health* 2009;20(2):119–134.
 26. **Fite A, Dykhuizen R, Litterick A, Golden M, Leifert C.** Effects of ascorbic acid, glutathione, thiocyanate, and iodide on antimicrobial activity of acidified nitrite. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(2):655–658.
 27. **Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL.** Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J.* 2003;17(11):1502–1504.
 28. **Nicola JP, Reyna-Neyra A, Carrasco N, Masini-Repiso AM.** Dietary iodide controls its own absorption through post-transcriptional regulation of the intestinal Na⁺/I⁻-symporter. *J. Physiol.* 2012;590(23):6013–6026.
 29. **Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA.** Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* 2014;94(2):355–382.
 30. **Zimmermann MB, Boelaert K.** Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(4):286–295.
 31. **Dumont J.** The Action of Thyrotropin on Thyroid Metabolism. In: *Vitamin Hormone.*; 1971:287–412.
 32. **Fekete C, Lechan RM.** Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: Role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front. Neuroendocrinol.* 2007;28(2–3):97–114.
 33. **Warner MH, Beckett GJ.** Mechanisms behind the non-thyroidal illness syndrome: an update. *J. Endocrinol.* 2010;205(1):1–13.
 34. **Vassart G, Dumont JE.** The Thyrotropin Receptor and the Regulation of Thyrocyte Function and Growth. *Endocr. Rev.* 1992;13(3):596–611.
 35. **Weintraub BD, Szkudlinski MW, Grossmann M.** Novel Insights into the Molecular Mechanisms of Human Thyrotropin Action: Structural, Physiological, and Therapeutic Implications for the Glycoprotein Hormone Family. *Endocr. Rev.* 1997;18(4):476–501.
 36. **Leoni SG, Galante PA, Ricarte-Filho JCM, Kimura ET.** Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCCl3. *Genomics* 2008;91(4):356–366.
 37. **Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S, Rousset B.** Characterization of the Rat Thyroid Iodide Transporter Using Anti-peptide Antibodies. *J. Biol. Chem.* 1997;272(29):18245–18249.
 38. **Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T, Endo T, Saito T.** Increased Expression of the Na⁺/I⁻-Symporter in Cultured Human Thyroid Cells Exposed to Thyrotropin and in Graves' Thyroid Tissue*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82(10):3331–3336.

39. **Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN, Davies TF.** Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002;99(24):15776 LP – 15781.
40. **Kogai T, Taki K, Brent GA.** Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer Endocr Relat Cancer* 2006;13(3):797–826.
41. **Riedel C, Levy O, Carrasco N.** Post-transcriptional Regulation of the Sodium/Iodide Symporter by Thyrotropin. *J. Biol. Chem.* 2001;276(24):21458–21463.
42. **Vadysirisack DD, Chen ESW, Zhang Z, Tsai MD, Chang GD, Jhiang SM.** Identification of in vivo phosphorylation sites and their functional significance in the sodium iodide symporter. *J. Biol. Chem.* 2007;282(51):36820–36828.
43. **Wassner AJ, Brown RS.** Congenital hypothyroidism. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2015;22(5):407–412.
44. **Refetoff S, Bassett JHD, Beck-Peccoz P, Bernal J, Brent G, Chatterjee K, De Groot LJ, Dumitrescu AM, Jameson JL, Kopp PA, Murata Y, Persani L, Samarut J, Weiss RE, Williams GR, Yen PM.** Classification and Proposed Nomenclature for Inherited Defects of Thyroid Hormone Action, Cell Transport, and Metabolism*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99(3):768–770.
45. **Schoenmakers N, Alatzoglou KS, Chatterjee VK, Dattani MT.** Recent advances in central congenital hypothyroidism. *J. Endocrinol.* 2015;227(3):R51–R71.
46. **Krude H, Kühnen P, Biebermann H.** Treatment of congenital thyroid dysfunction: Achievements and challenges. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015;29(3):399–413.
47. **Nicola JP, Nazar M, Serrano-Nascimento C, Goulart-Silva F, Sobrero G, Testa G, Nunes MT, Muñoz L, Miras M, Masini-Repiso AM.** Iodide Transport Defect: Functional Characterization of a Novel Mutation in the Na⁺/I⁻ Symporter 5'-Untranslated Region in a Patient with Congenital Hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(7):E1100–E1107.
48. **Watanabe Y, Ebrhim RS, Abdullah MA, Weiss RE.** A Novel Missense Mutation in the SLC5A5 Gene in a Sudanese Family with Congenital Hypothyroidism. *Thyroid* 2018;28(8):1068–1070.
49. **Bruellman RJ, Watanabe Y, Ebrhim RS, Creech MK, Abdullah MA, Dumitrescu AM, Refetoff S, Weiss RE.** Increased prevalence of TG and TPO mutations in Sudanese children with congenital hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019:2008–2010.
50. **Makretskaya N, Bezlepina O, Kolodkina A, Kiyayev A, Vasilyev E V., Petrov V, Kalinenkova S, Malievsky O, Dedov II, Tiulpakov A.** High frequency of mutations in “dys-hormonogenesis genes” in severe congenital hypothyroidism. Plateroti M, ed. *PLoS One* 2018;13(9):e0204323.
51. **Fröhlich H, Boini KM, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Ureche ON, Föller M, Eichenmüller M, Shumilina E, Pathare G, Singh AK, Seidler U, Pfeifer KE, Lang F.** Hypothyroidism of gene-targeted mice lacking Kcnq1. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 2011;461(1):45–52.
52. **Roepke TK, King EC, Reyna-Neyra A, Paroder M, Purtell K, Koba W, Fine E, Lerner DJ, Carrasco N, Abbott GW.** Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis. *Nat. Med.* 2009;15(10):1186–1194.
53. **Purtell K, Paroder-Belenitsky M, Reyna-Neyra A, Nicola JP, Koba W, Fine E, Carrasco N, Abbott GW.** The KCNQ1-KCNE2 K⁺ channel is required for adequate thyroid I⁻ uptake. *FASEB J.* 2012;26(8):3252–3259.
54. **Szinnai G, Polak M, Kosugi S, Derrien C, David V, Lucidarme N, Czernichow P.** Extending the Clinical Heterogeneity of Iodide Transport Defect (ITD): A Novel Mutation R124H of the Sodium/Iodide Symporter Gene and Review of Genotype-Phenotype Correlations in ITD. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91(4):1199–1204.
55. **Kosugi S.** A Novel Mutation in the Sodium/Iodide Symporter Gene in the Largest Family with Iodide Transport Defect. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84(9):3248–3253.

56. **Ferrandino G, Kaspari RR, Reyna-Neyra A, Boutagy NE, Sinusas AJ, Carrasco N.** An extremely high dietary iodide supply forestalls severe hypothyroidism in Na⁺/I⁻ symporter (NIS) knockout mice. *Sci. Rep.* 2017;7(1):5329.
57. **Hannoush ZC, Weiss RE.** Defects of Thyroid Hormone Synthesis and Action. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2017;46(2):375–388.
58. **Ferrandino G, Nicola JP, Sánchez YE, Echeverria I, Liu Y, Amzel LM, Carrasco N.** Na⁺ coordination at the Na⁺ site of the Na⁺/I⁻ symporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016;113(37):E5379–E5388.
59. **Paroder V, Nicola JP, Ginter CS, Carrasco N.** The iodide-transport-defect-causing mutation R124H: a δ-amino group at position 124 is critical for maturation and trafficking of the Na⁺/I⁻ symporter. *J. Cell Sci.* 2013;126(Pt 15):3305–13.
60. **De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N.** Molecular analysis of a congenital iodide transport defect: G543E impairs maturation and trafficking of the Na⁺/I⁻ symporter. *Mol. Endocrinol.* 2005;19(11):2847–58.
61. **Nicola JP, Reyna-Neyra A, Saenger P, Rodriguez-Buritica DF, Godoy JDG, Muzumdar R, Amzel LM, Carrasco N.** Sodium/iodide symporter mutant V270E causes stunted growth but no cognitive deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015;100(10):E1353–E1361.
62. **Alexander EK, Larsen PR.** Radioiodine for Thyroid Cancer — Is Less More? *N. Engl. J. Med.* 2012;366(18):1732–1733.
63. **Ross DS.** Radioiodine Therapy for Hyperthyroidism. *N. Engl. J. Med.* 2011;364(6):542–550.
64. **Pohlenz J, Duprez L, Weiss RE, Vassart G, Refetoff S, Costagliola S.** Failure of Membrane Targeting Causes the Functional Defect of Two Mutant Sodium Iodide Symporters1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000;85(7):2366–2369.
65. **Darrouzet E, Graslin F, Marcellin D, Tcheremisinova I, Marchetti C, Salleron L, Pognonec P, Pourcher T.** A systematic evaluation of sorting motifs in the sodium-iodide symporter (NIS). *Biochem. J.* 2016;473(7):919–928.
66. **Reiners C, Hänscheid H, Luster M, Lassmann M, Verburg FA.** Radioiodine for remnant ablation and therapy of metastatic disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2012;8:130.
67. **Mazzaferri EL, Jhiang SM.** Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am. J. Med.* 1994;97(5):418–428.
68. **Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, Caillou B, Ricard M, Lumbroso JD, De Vathaire F, Schlumberger M.** Long-Term Outcome of 444 Patients with Distant Metastases from Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma: Benefits and Limits of Radioiodine Therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91(8):2892–2899.
69. **Mazzaferri EL.** Thyroid Remnant 131 I Ablation for Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 1997;7(2):265–271.
70. **Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L.** 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1–133.
71. **Schlumberger M, Lacroix L, Russo D, Filetti S, Bidart J-M.** Defects in iodide metabolism in thyroid cancer and implications for the follow-up and treatment of patients. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2007;3(3):260–269.
72. **Cancer Genome Atlas Research Network.** Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* 2014;159(3):676–690.
73. **Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, Dogan S, Ricarte-Filho JC, Krishnamoorthy GP,**

- Xu B, Schultz N, Berger MF, Sander C, Taylor BS, Ghossein R, Ganly I, Fagin JA.** Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J. Clin. Invest.* 2016;126(3):1052–1066.
74. **Hong CM, Ahn B-C.** Redifferentiation of Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer for Reapplication of I-131 Therapy. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2017;8:260.
75. **Spitzweg C, Bible KC, Hofbauer LC, Morris JC.** Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: the sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(10):830–842.
76. **Dohán O, Baloch Z, Bánrévi Z, Livolsi V, Carrasco N.** Predominant Intracellular Overexpression of the Na⁺/I⁻ Symporter (NIS) in a Large Sampling of Thyroid Cancer Cases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(6):2697–2700.
77. **Kollecker I, von Wasielewski R, Langner C, Müller JA, Spitzweg C, Kreipe H, Brabant G.** Subcellular Distribution of the Sodium Iodide Symporter in Benign and Malignant Thyroid Tissues. *Thyroid* 2012;22(5):529–535.
78. **Tavares C, Coelho MJ, Eloy C, Melo M, da Rocha AG, Pestana A, Batista R, Ferreira LB, Rios E, Selmi-Ruby S, Cavadas B, Pereira L, Sobrinho Simões M, Soares P.** NIS expression in thyroid tumors, relation with prognosis clinicopathological and molecular features. *Endocr. Connect.* 2017;7(1):78–90.
79. **Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, Greco RS, Dohán O, Carrasco N.** Immunohistochemical Profile of the Sodium/Iodide Symporter in Thyroid, Breast, and Other Carcinomas Using High Density Tissue Microarrays and Conventional Sections. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88(4):1880–1888.
80. **Neumann S, Schuchardt K, Reske A, Reske A, Emmrich P, Paschke R.** Lack of Correlation for Sodium Iodide Symporter mRNA and Protein Expression and Analysis of Sodium Iodide Symporter Promoter Methylation in Benign Cold Thyroid Nodules. *Thyroid* 2004;14(2):99–111.
81. **Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muramatsu A, Onaya T.** Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.* 1998;101(7):1296–1300.
82. **Trouttet-Masson S, Selmi-Ruby S, Bernier-Valentin F, Porra V, Berger-Dutrieux N, Decaussin M, Peix J-L, Perrin A, Bournaud C, Orgiazzi J, Borson-Chazot F, Franc B, Rousset B.** Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *Am. J. Pathol.* 2004;165(1):25–34.
83. **Tonacchera M, Viacava P, Agretti P, de Marco G, Perri A, di Cosmo C, de Servi M, Miccoli P, Lippi F, Naccarato AG, Pinchera A, Chiovato L, Vitti P.** Benign Nonfunctioning Thyroid Adenomas Are Characterized by a Defective Targeting to Cell Membrane or a Reduced Expression of the Sodium Iodide Symporter Protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87(1):352–357.
84. **Russo D, Manole D, Arturi F, Suarez HG, Schlumberger M, Filetti S, Derwahl M.** Absence of Sodium/Iodide Symporter Gene Mutations in Differentiated Human Thyroid Carcinomas. *Thyroid* 2001;11(1):37–39.
85. **Riesco-Eizaguirre G, Gutiérrez-Martínez P, García-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P.** The oncogene BRAFV600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr. Relat. Cancer* 2006;13(1):257–269.
86. **Smith VE, Read ML, Turnell AS, Watkins RJ, Watkinson JC, Lewy GD, Fong JCW, James SR, Eggo MC, Boelaert K, Franklyn JA, McCabe CJ.** A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer. *J. Cell Sci.* 2009;122(18):3393–3402.
87. **Smith VE, Read ML, Turnell AS, Sharma N, Lewy GD, Fong JCW, Seed RI, Kwan P, Ryan G, Mehanna H, Chan SY, Darras VM, Boelaert K, Franklyn JA, McCabe CJ.** PTTG-Binding Factor (PBF) is a novel regulator of the thyroid hormone transporter MCT8. *Endocrinology* 2012;153(7):3526–3536.
88. **Smith VE, Sharma N, Watkins RJ, Read ML, Ryan GA, Kwan PP, Martin A, Watkinson JC, Boelaert K, Franklyn JA, McCabe C.** Manipulation of PBF/PTTG1IP phosphorylation status; a potential new therapeutic strategy for

- improving radioiodine uptake in thyroid and other tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(7):2876–2886.
89. **Amit M, Na'ara S, Francis D, Matanis W, Zolotov S, Eisenhaber B, Eisenhaber F, Weiler Sagie M, Malkin L, Billan S, Charas T, Gil Z.** Post-translational Regulation of Radioactive Iodine Therapy Response in Papillary Thyroid Carcinoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2017;109(12):1–10.
 90. **Fletcher A, Read ML, Thornton CEM, Lerner DP, Poole VL, Brookes K, Nieto HR, Alshahrani M, Thompson RJ, Lavery GG, Landa I, Fagin JA, Campbell MJ, Boelaert K, Turnell AS, Smith VE, McCabe CJ.** Targeting novel sodium iodide symporter interactors ADP-ribosylation factor 4 (ARF4) and valosin-containing protein (VCP) enhances radioiodine uptake. *Cancer Res.* 2019;4:canres.1957.2019.
 91. **Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Zhang L, Fagin JA.** Conditional BRAF V600E Expression Induces DNA Synthesis, Apoptosis, Dedifferentiation, and Chromosomal Instability in Thyroid PCCL3 Cells. *Cancer Res.* 2005;65(6):2465–2473.
 92. **Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, Pentlow KS, Zanzonico PB, Haque S, Gavane S, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Domínguez JM, Shen R, Tuttle RM, Larson SM, Fagin JA.** Selumetinib-Enhanced Radioiodine Uptake in Advanced Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(7):623–632.
 93. **Rothenberg SM, McFadden DG, Palmer EL, Daniels GH, Wirth LJ.** Redifferentiation of Iodine-Refractory BRAF V600E-Mutant Metastatic Papillary Thyroid Cancer with Dabrafenib. *Clin. Cancer Res.* 2015;21(5):1028–1035.
 94. **Nagarajah J, Le M, Knauf JA, Ferrandino G, Montero-Conde C, Pillarsetty N, Bolaender A, Irwin C, Krishnamoorthy GP, Saqcena M, Larson SM, Ho AL, Seshan V, Ishii N, Carrasco N, Rosen N, Weber WA, Fagin JA.** Sustained ERK inhibition maximizes responses of BrafV600E thyroid cancers to radioiodine. *J. Clin. Invest.* 2016;126(11):4119–4124.
 95. **Dunn LA, Sherman EJ, Baxi SS, Tchekmedyian V, Grewal RK, Larson SM, Pentlow KS, Haque S, Tuttle RM, Sabra MM, Fish S, Boucai L, Walters J, Ghossein RA, Seshan VE, Ni A, Li D, Knauf JA, Pfister DG, Fagin JA, Ho AL.** Vemurafenib Redifferentiation of BRAF Mutant, RAI-Refractory Thyroid Cancers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019;104(5):1417–1428.
 96. **Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Hua Zhao Q, Fu Deng H, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, Carrasco N.** The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat. Med.* 2000;6(8):871–878.
 97. **Tanos B, Rodriguez-Boulan E.** The epithelial polarity program: Machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* 2008;27(55):6939–6957.
 98. **Caplan MJ.** Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. *Am. J. Physiol. Physiol.* 1997;272(4):F425–F429.
 99. **Nelson WJ, Yeaman C.** Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol.* 2001;11(12):483–486.
 100. **Arvan P, Kim PS, Kuliawat R, Prabakaran D, Muresan Z, Yoo SE, Abu Hossain S.** Intracellular protein transport to the thyrocyte plasma membrane: potential implications for thyroid physiology. *Thyroid* 1997;7(1):89–105.
 101. **Griffiths G, Simons K.** The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science (80-)*. 1986;234(4775):438–443.
 102. **Ang AL, Taguchi T, Francis S, Fölsch H, Murrells LJ, Pypaert M, Warren G, Mellman I.** Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 2004;167(3):531–543.
 103. **Hoekstra D, Tyteca D, van IJendoorn SCD.** The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development. *J. Cell Sci.* 2004;117(11):2183 LP – 2192.

104. **Fölsch H, Mattila PE, Weisz OA.** Taking the scenic route: biosynthetic traffic to the plasma membrane in polarized epithelial cells. *Traffic* 2009;10(8):972–981.
105. **Lock JG, Stow JL.** Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* 2005;16(4):1744–1755.
106. **Cresawn KO, Potter BA, Oztan A, Guerriero CJ, Ihrke G, Goldenring JR, Apodaca G, Weisz OA.** Differential involvement of endocytic compartments in the biosynthetic traffic of apical proteins. *EMBO J.* 2007;26(16):3737–3748.
107. **Rodriguez-Boulan E, Macara IG.** Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014;15(4):225–242.
108. **Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G, Müsch A.** Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6(3):233–247.
109. **Weisz OA, Rodriguez-Boulan E.** Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J. Cell Sci.* 2009;122(23):4253–4266.
110. **Jaulin F, Kreitzer G.** KIF17 stabilizes microtubules and contributes to epithelial morphogenesis by acting at MT plus ends with EB1 and APC. *J. Cell Biol.* 2010;190(3):443–460.
111. **Jaulin F, Xue X, Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G.** Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev. Cell* 2007;13(4):511–522.
112. **Noda Y, Okada Y, Saito N, Setou M, Xu Y, Zhang Z, Hirokawa N.** KIFC3, a microtubule minus end–directed motor for the apical transport of annexin XIIIb–associated Triton-insoluble membranes. *J. Cell Biol.* 2001;155(1):77–88.
113. **Tai AW, Chuang JZ, Sung CH.** Cytoplasmic dynein regulation by subunit heterogeneity and its role in apical transport. *J. Cell Biol.* 2001;153(7):1499–1509.
114. **Smythe E, Ayscough KR.** Actin regulation in endocytosis. *J. Cell Sci.* 2006;119(22):4589 LP – 4598.
115. **Harris KP, Tepass U.** Cdc42 and Vesicle Trafficking in Polarized Cells. *Traffic* 2010;11(10):1272–1279.
116. **Lanzetti L.** Actin in membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007;19(4):453–458.
117. **Au JS-Y, Puri C, Ihrke G, Kendrick-Jones J, Buss F.** Myosin VI is required for sorting of AP-1B-dependent cargo to the basolateral domain in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 2007;177(1):103–114.
118. **Roland JT, Bryant DM, Datta A, Itzen A, Mostov KE, Goldenring JR.** Rab GTPase-Myo5B complexes control membrane recycling and epithelial polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(7):2789–2794.
119. **Carroll KS.** Role of Rab9 GTPase in Facilitating Receptor Recruitment by TIP47. *Science (80-).* 2001;292(5520):1373–1376.
120. **Miserey-Lenkei S, Chalancon G, Bardin S, Formstecher E, Goud B, Echard A.** Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 2010;12:645.
121. **Echard A.** Interaction of a Golgi-Associated Kinesin-Like Protein with Rab6. *Science (80-).* 1998;279(5350):580–585.
122. **Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, Olkkonen VM, Neefjes J.** Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *J. Cell Biol.* 2007;176(4):459–471.
123. **Nielsen E, Christoforidis S, Uttenweiler-Joseph S, Miaczynska M, Dewitte F, Wilm M, Hoflack B, Zerial M.** Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE

- finger domain. *J. Cell Biol.* 2000;151(3):601–612.
124. **Ohya T, Miaczynska M, Coskun Ü, Lommer B, Runge A, Drechsel D, Kalaidzidis Y, Zerial M.** Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature* 2009;459(7250):1091–1097.
 125. **Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier J-M, Brech A, Callaghan J, Toh B-H, Murphy C, Zerial M, Stenmark H.** EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 1998;394(6692):494–498.
 126. **Klöpffer TH, Kienle N, Fasshauer D, Munro S.** Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol.* 2012;10(1):71.
 127. **Pfeffer S, Aivazian D.** Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5(11):886–896.
 128. **Rodriguez-Boulán E, Powell SK.** Polarity of Epithelial and Neuronal Cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1992;8(1):395–427.
 129. **Matter K, Mellman I.** Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994;6(4):545–554.
 130. **Tompa P, Davey NE, Gibson TJ, Babu MM.** A Million Peptide Motifs for the Molecular Biologist. *Mol. Cell* 2014;55(2):161–169.
 131. **Pimplikar SW, Ikonen E, Simons K.** Basolateral protein transport in streptolysin O-permeabilized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 1994;125(5):1025–1035.
 132. **Müsch A, Xu H, Shields D, Rodriguez-Boulán E.** Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J. Cell Biol.* 1996;133(3):543–558.
 133. **Soza A, Norambuena A, Cancino J, de la Fuente E, Henklein P, González A.** Sorting Competition with Membrane-permeable Peptides in Intact Epithelial Cells Revealed Discrimination of Transmembrane Proteins Not Only at the trans-Golgi Network but Also at Pre-Golgi Stages. *J. Biol. Chem.* 2004;279(17):17376–17383.
 134. **Mayor S, Riezman H.** Sorting GPI-anchored proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5(2):110–120.
 135. **Lisanti MP.** A glycosphospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 1989;109(5):2145–2156.
 136. **Fiedler K, Simons K.** The role of n-glycans in the secretory pathway. *Cell* 1995;81(3):309–312.
 137. **Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulán E.** The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 1997;139(4):929–940.
 138. **Scheiffele P, Roth MG, Simons K.** Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 1997;16(18):5501–5508.
 139. **Kundu A, Avalos RT, Sanderson CM, Nayak DP.** Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Virol.* 1996;70(9):6508–6515.
 140. **Le Bivic A, Garcia M, Rodriguez-Boulán E.** Ricin-resistant Madin-Darby canine kidney cells missort a major endogenous apical sialoglycoprotein. *J. Biol. Chem.* 1993;268(10):6909–6916.
 141. **Lisanti MP, Le Bivic A, Saltiel AR, Rodriguez-Boulán E.** Preferred apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchored proteins: A highly conserved feature of the polarized epithelial cell phenotype. *J. Membr. Biol.* 1990;113(2):155–167.
 142. **Scheiffele P, Verkade P, Fra AM, Virta H, Simons K, Ikonen E.** Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of

- MDCK cells. *J. Cell Biol.* 1998;140(4):795–806.
143. **Matter K, Hunziker W, Mellman I.** Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: The cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 1992;71(5):741–753.
144. **Mellman I, Nelson WJ.** Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9(11):833–845.
145. **Edeling MA, Smith C, Owen D.** Life of a clathrin coat: Insights from clathrin and AP structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006;7(1):32–44.
146. **Bonifacino JS, Traub LM.** Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 2003;72(1):395–447.
147. **Deora AA, Gravotta D, Kreitzer G, Hu J, Bok D, Rodriguez-Boulan E.** The basolateral targeting signal of CD147 (EMMPRIN) consists of a single leucine and is not recognized by retinal pigment epithelium. *Mol. Biol. Cell* 2004;15(9):4148–4165.
148. **Wolff SC, Qi A-D, Harden TK, Nicholas R a.** Charged residues in the C-terminus of the P2Y1 receptor constitute a basolateral-sorting signal. *J. Cell Sci.* 2010;123(Pt 14):2512–20.
149. **Le Gall AH, Powell SK, Yeaman CA, Rodriguez-Boulan E.** The Neural Cell Adhesion Molecule Expresses a Tyrosine-independent Basolateral Sorting Signal. *J. Biol. Chem.* 1997;272(7):4559–4567.
150. **Aroeti B, Kosen PA, Kuntz ID, Cohen FE, Mostov KE.** Mutational and secondary structural analysis of the basolateral sorting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J. Cell Biol.* 1993;123(5):1149–1160.
151. **He C, Hobert M, Friend L, Carlin C.** The Epidermal Growth Factor Receptor Juxtamembrane Domain Has Multiple Basolateral Plasma Membrane Localization Determinants, Including a Dominant Signal with a Polyproline Core. *J. Biol. Chem.* 2002;277(41):38284–38293.
152. **Dillon C, Creer A, Kerr K, Kümin A, Dickson C.** Basolateral targeting of ERBB2 is dependent on a novel bipartite juxtamembrane sorting signal but independent of the C-terminal ERBIN-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(18):6553–6563.
153. **Dempsey PJ, Meise KS, Coffey RJ.** Basolateral sorting of transforming growth factor- α precursor in polarized epithelial cells: characterization of cytoplasmic domain determinants. *Exp. Cell Res.* 2003;285(2):159–174.
154. **Magadan JG, Bonifacino JS.** Transmembrane Domain Determinants of CD4 Downregulation by HIV-1 Vpu. *J. Virol.* 2012;86(2):757–772.
155. **Gut A, Kappeler F, Hyka N, Balda MS, Hauri HP, Matter K.** Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J.* 1998;17(7):1919–1929.
156. **Muth TR, Caplan MJ.** Transport Protein Trafficking in Polarized Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003;19(1):333–366.
157. **Brewer CB, Roth MG.** A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 1991;114(3):413–421.
158. **Hirst J, D. Barlow L, Francisco GC, Sahlender DA, Seaman MNJ, Dacks JB, Robinson MS.** The Fifth Adaptor Protein Complex. Schmid SL, ed. *PLoS Biol.* 2011;9(10):e1001170.
159. **Owen DJ, Collins BM, Evans PR.** ADAPTORS FOR CLATHRIN COATS: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004;20(1):153–191.
160. **Pearse BM, Smith CJ, Owen DJ.** Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2000;10(2):220–228.

161. **Deborde S, Perret E, Gravotta D, Deora A, Salvarezza S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E.** Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* 2008;452(7188):719–723.
162. **Ahle S, Ungewickell E.** Identification of a clathrin binding subunit in the HA2 adaptor protein complex. *J. Biol. Chem.* 1989;264(33):20089–20093.
163. **Thieman JR, Mishra SK, Ling K, Doray B, Anderson RA, Traub LM.** Clathrin regulates the association of PIPK γ 661 with the AP-2 adaptor beta2 appendage. *J. Biol. Chem.* 2009;284(20):13924–13939.
164. **Goodman OB, Keen JH.** The α Chain of the AP-2 Adaptor Is a Clathrin Binding Subunit. *J. Biol. Chem.* 1995;270(40):23768–23773.
165. **Maeder ML, Gersbach CA.** Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol. Ther.* 2016;24(3):430–446.
166. **Polishchuk RS, Pietro ES, Pentima A Di, Teté S, Bonifacino JS.** Ultrastructure of Long-Range Transport Carriers Moving from the trans Golgi Network to Peripheral Endosomes. *Traffic* 2006;7(8):1092–1103.
167. **Rapoport I, Chen YC, Cupers P, Shoelson SE, Kirchhausen T.** Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* 1998;17(8):2148–2155.
168. **Slepnev VI, De Camilli P.** Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 2000;1:161.
169. **Owen DJ, Evans PR.** A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* 1998;282(5392):1327–1332.
170. **Ohno H, Stewart J, Fournier M, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino J.** Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science (80-.).* 1995;269(5232):1872–1875.
171. **Mattera R, Boehm M, Chaudhuri R, Prabhu Y, Bonifacino JS.** Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. *J. Biol. Chem.* 2011;286(3):2022–2030.
172. **Ohno H, Tomemori T, Nakatsu F, Okazaki Y, Aguilar RC, Foelsch H, Mellman I, Saito T, Shirasawa T, Bonifacino JS.** μ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells 1. *FEBS Lett.* 1999;449(2–3):215–220.
173. **Fölsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I.** A Novel Clathrin Adaptor Complex Mediates Basolateral Targeting in Polarized Epithelial Cells. *Cell* 1999;99(2):189–198.
174. **Fölsch H, Pypaert M, Maday S, Pelletier L, Mellman I.** The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *J. Cell Biol.* 2003;163(2):351–362.
175. **Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J.** Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(5):409–414.
176. **Gan Y, McGraw TE, Rodriguez-Boulan E.** The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat. Cell Biol.* 2002;4(8):605–609.
177. **Caceres PS, Gravotta D, Zager PJ, Dephoure N, Rodriguez-Boulan E.** Quantitative proteomics of MDCK cells identify unrecognized roles of clathrin adaptor AP-1 in polarized distribution of surface proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019:201821076.
178. **Simmen T, Höning S, Icking A, Tikkanen R, Hunziker W.** AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat. Cell Biol.* 2002;4(2):154–159.
179. **Hirst J, Irving C, Borner GHH.** Adaptor Protein Complexes AP-4 and AP-5: New Players in Endosomal Trafficking

and Progressive Spastic Paraplegia. *Traffic* 2013;14(2):153–164.

180. **Nishimura N, Plutner H, Hahn K, Balch WE.** The subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002;99(10):6755–6760.
181. **Puertollano R.** Sorting of Mannose 6-Phosphate Receptors Mediated by the GGAs. *Science (80-)*. 2001;292(5522):1712–1716.
182. **Misra S, Puertollano R, Kato Y, Bonifacino JS, Hurley JH.** Structural basis for acidic-cluster dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature* 2002;415(6874):933–937.
183. **Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM.** The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 2001;20(9):2180–2190.
184. **Chen HJ, Yuan J, Lobel P.** Systematic Mutational Analysis of the Cation-independent Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor Cytoplasmic Domain. *J. Biol. Chem.* 1997;272(11):7003–7012.
185. **Zhu Y, Doray B, Poussu A, Lehto V-P, Kornfeld S.** Binding of GGA2 to the Lysosomal Enzyme Sorting Motif of the Mannose 6-Phosphate Receptor. *Science (80-)*. 2001;292(5522):1716 LP – 1718.
186. **Schmidt MR, Maritzen T, Kukhtina V, Higman VA, Doglio L, Barak NN, Strauss H, Oschkinat H, Dotti CG, Haucke V.** Regulation of endosomal membrane traffic by a Gadkin/AP-1/kinesin KIF5 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106(36):15344–15349.
187. **Nakagawa T, Setou M, Seog D, Ogasawara K, Dohmae N, Takio K, Hirokawa N.** A Novel Motor, KIF13A, Transports Mannose-6-Phosphate Receptor to Plasma Membrane through Direct Interaction with AP-1 Complex. *Cell* 2000;103(4):569–581.
188. **Hirokawa N.** Organelle transport along microtubules — the role of KIFs. *Trends Cell Biol.* 1996;6(4):135–141.
189. **Hirokawa N.** Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. *Science (80-)*. 1998;279(5350):519–526.
190. **Brendza RP, Serbus LR, Duffy JB, Saxton WM.** A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein. *Science* 2000;289(5487):2120–2122.
191. **Vale RD, Fletterick RJ.** The design plan of kinesin motors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997;13(1):745–777.
192. **Kim AJ, Endow SA.** A kinesin family tree. *J. Cell Sci.* 2000;113 Pt 21(21):3681–2.
193. **Setou M.** Kinesin Superfamily Motor Protein KIF17 and mLin-10 in NMDA Receptor-Containing Vesicle Transport. *Science (80-)*. 2000;288(5472):1796–1802.
194. **Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N.** All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001;98(13):7004–7011.
195. **Aizawa H.** Kinesin family in murine central nervous system. *J. Cell Biol.* 1992;119(5):1287–1296.
196. **Hirokawa N, Pfister KK, Yorifuji H, Wagner MC, Brady ST, Bloom GS.** Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* 1989;56(5):867–878.
197. **Dagenbach EM, Endow SA.** A new kinesin tree. *J. Cell Sci.* 2004;117(1):3 LP – 7.
198. **Vale R, Reese T, Sheetz M.** Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 1985;42(1):39–50.
199. **Brady ST.** A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 1985;317(6032):73–75.

200. **Bloom GS, Wagner MC, Pfister KK, Brady ST.** Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochemistry* 1988;27(9):3409–3416.
201. **Caponigro G, Abedi MR, Hurlburt AP, Maxfield A, Judd W, Kamb A.** Transdominant genetic analysis of a growth control pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95(13):7508–7513.
202. **Kanai Y, Okada Y, Tanaka Y, Harada A, Terada S, Hirokawa N.** KIF5C, a Novel Neuronal Kinesin Enriched in Motor Neurons. *J. Neurosci.* 2000;20(17):6374–6384.
203. **Dodding MP, Mitter R, Humphries AC, Way M.** A kinesin-1 binding motif in vaccinia virus that is widespread throughout the human genome. *EMBO J.* 2011;30(22):4523–4538.
204. **Aoyama T, Hata S, Nakao T, Tanigawa Y, Oka C, Kawaichi M.** Cayman ataxia protein caytaxin is transported by kinesin along neurites through binding to kinesin light chains. *J. Cell Sci.* 2009;122(22):4177–4185.
205. **Araki Y, Kawano T, Taru H, Saito Y, Wada S, Miyamoto K, Kobayashi H, Ishikawa HO, Ohsugi Y, Yamamoto T, Matsuno K, Kinjo M, Suzuki T.** The novel cargo Alcadein induces vesicle association of kinesin-1 motor components and activates axonal transport. *EMBO J.* 2007;26(6):1475–1486.
206. **Trejo HE, Lecuona E, Grillo D, Szeleifer I, Nekrasova OE, Gelfand VI, Sznajder JI.** Role of kinesin light chain-2 of kinesin-1 in the traffic of Na,K-ATPase-containing vesicles in alveolar epithelial cells. *FASEB J.* 2010;24(2):374–382.
207. **Konecna A, Frischknecht R, Kinter J, Ludwig A, Steuble M, Meskenaite V, Indermühle M, Engel M, Cen C, Mateos J-M, Streit P, Sonderegger P.** Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1. *Mol. Biol. Cell* 2006;17(8):3651–3663.
208. **McGuire JR, Rong J, Li S-H, Li X-J.** Interaction of Huntingtin-associated Protein-1 with Kinesin Light Chain. *J. Biol. Chem.* 2006;281(6):3552–3559.
209. **Pernigo S, Lamprecht A, Steiner RA, Dodding MP.** Structural Basis for Kinesin-1:Cargo Recognition. *Science (80-).* 2013;340(6130):356–359.
210. **Bowman AB, Kamal A, Ritchings BW, Philp AV, McGrail M, Gindhart JG, Goldstein LSB.** Kinesin-Dependent Axonal Transport Is Mediated by the Sunday Driver (SYD) Protein. *Cell* 2000;103(4):583–594.
211. **Rosa-Ferreira C, Munro S.** Arl8 and SKIP Act Together to Link Lysosomes to Kinesin-1. *Dev. Cell* 2011;21(6):1171–1178.
212. **Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA-K, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist P-H, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F.** Tissue-based map of the human proteome. *Science (80-).* 2015;347(6220):1260419–1260419.
213. **Junco A, Bhullar B, Tarnasky HA, van der Hoorn FA.** Kinesin light-chain KLC3 expression in testis is restricted to spermatids. *Biol. Reprod.* 2001;64(5):1320–1330.
214. **Bayrakli F, Poyrazoglu HG, Yuksel S, Yakicier C, Erguner B, Sagiroglu MS, Yuceturk B, Ozer B, Doganay S, Tanrikulu B, Seker A, Akbulut F, Ozen A, Per H, Kumandas S, Torun YA, Bayri Y, Sakar M, Dagainar A, Ziyal I.** Hereditary spastic paraplegia with recessive trait caused by mutation in KLC4 gene. *J. Hum. Genet.* 2015;60(12):763–768.
215. **Woźniak MJ, Allan VJ.** Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J.* 2006;25(23):5457–5468.
216. **Stauber T, Simpson JC, Pepperkok R, Vernos I.** A Role for Kinesin-2 in COPI-Dependent Recycling between the ER and the Golgi Complex. *Curr. Biol.* 2006;16(22):2245–2251.

217. **Lippincott-Schwartz J, Cole NB.** Roles for microtubules and kinesin in membrane traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Biochem. Soc. Trans.* 1995;23(3):544–548.
218. **D’Amico E, Gayral S, Massart C, Van Sande J, Reiter JF, Dumont JE, Robaye B, Schurmans S.** Thyroid-specific inactivation of KIF3A alters the TSH signaling pathway and leads to hypothyroidism. *J. Mol. Endocrinol.* 2013;50(3):375–387.
219. **Beau I, Groyer-Picard MT, Desroches A, Condamine E, Leprince J, Tome JP, Dessen P, Vaudry H, Misrahi M.** The basolateral sorting signals of the thyrotropin and luteinizing hormone receptors: an unusual family of signals sharing an unusual distal intracellular localization, but unrelated in their structures. *Mol Endocrinol* 2004;18(3):733–746.
220. **Ghinea N, Baratti-Elbaz C, De Jesus-Lucas A, Milgrom E.** TSH Receptor Interaction with the Extracellular Matrix: Role on Constitutive Activity and Sensitivity to Hormonal Stimulation. *Mol. Endocrinol.* 2002;16(5):912–923.
221. **Singh SP, McDonald D, Hope TJ, Prabhakar BS.** Upon Thyrotropin Binding the Thyrotropin Receptor Is Internalized and Localized to Endosome. *Endocrinology* 2004;145(2):1003–1010.
222. **Brown D, Breton S.** Sorting proteins to their target membranes. *Kidney Int.* 2000;57(3):816–824.
223. **Chung J-J, Shikano S, Hanyu Y, Li M.** Functional diversity of protein C-termini: more than zipcoding? *Trends Cell Biol.* 2002;12(3):146–150.
224. **Kim SK.** Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9(6):853–859.
225. **Sheng M, Sala C.** PDZ Domains and the Organization of Supramolecular Complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001;24(1):1–29.
226. **Voltz JW, Weinman EJ, Shenolikar S.** Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene* 2001;20:6309.
227. **Ivarsson Y.** Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS Lett.* 2012;586(17):2638–2647.
228. **Chen JR, Chang BH, Allen JE, Stiffler MA, MacBeath G.** Predicting PDZ domain–peptide interactions from primary sequences. *Nat. Biotechnol.* 2008;26(9):1041–1045.
229. **Ernst A, Appleton BA, Ivarsson Y, Zhang Y, Gfeller D, Wiesmann C, Sidhu SS.** A structural portrait of the PDZ domain family. *J. Mol. Biol.* 2014;426(21):3509–3519.
230. **Tonikian R, Zhang Y, Sazinsky SL, Currell B, Yeh JH, Reva B, Held HA, Appleton BA, Evangelista M, Wu Y, Xin X, Chan AC, Seshagiri S, Lasky LA, Sander C, Boone C, Bader GD, Sidhu SS.** A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol.* 2008;6(9):2043–2059.
231. **Lahuna O, Quellari M, Achard C, Nola S, Méduri G, Navarro C, Vitale N, Borg J-P, Misrahi M.** Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib–βPIX–GIT1–ARF6 pathway. *EMBO J.* 2005;24(7):1364–1374.
232. **Bilder D, Schober M, Perrimon N.** Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat. Cell Biol.* 2003;5(1):53–58.
233. **Legouis R, Jaulin-Bastard F, Schott S, Navarro C, Borg JP, Labouesse M.** Basolateral targeting by leucine-rich repeat domains in epithelial cells. *EMBO Rep.* 2003;4(11):1096–1102.
234. **Mircescu H, Steuve S, Savonet V, Degraef C, Mellor H, Dumont JE, Maenhaut C, Pirson I.** Identification and characterization of a novel activated RhoB binding protein containing a PDZ domain whose expression is specifically modulated in thyroid cells by cAMP. *Eur. J. Biochem.* 2002;269(24):6241–6249.
235. **Ma R, Morshed SA, Latif R, Davies TF.** TAZ Induction Directs Differentiation of Thyroid Follicular Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Thyroid* 2017;27(2):292–299.

236. **Banworth MJ, Li G.** Consequences of Rab GTPase dysfunction in genetic or acquired human diseases. *Small GTPases* 2018;9(1–2):158–181.
237. **Zappa F, Failli M, De Matteis MA.** The Golgi complex in disease and therapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2018;50:102–116.
238. **Winter EE.** Elevated Rates of Protein Secretion, Evolution, and Disease Among Tissue-Specific Genes. *Genome Res.* 2003;14(1):54–61.
239. **De Matteis MA, Luini A.** Mendelian Disorders of Membrane Trafficking. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(10):927–938.
240. **Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP.** Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel γ subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat. Genet.* 1995;11(1):76–82.
241. **Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ.** Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(19):1992–2001.
242. **Lin W, Popko B.** Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nat. Neurosci.* 2009;12(4):379–385.
243. **Dowling JJ, Gibbs EM, Feldman EL.** Membrane traffic and muscle: Lessons from human disease. *Traffic* 2008;9(7):1035–1043.
244. **Setta-Kaffetzi N, Simpson MA, Navarini AA, Patel VM, Lu H-C, Allen MH, Duckworth M, Bachelez H, Burden AD, Choon S-E, Griffiths CEM, Kirby B, Kolios A, Seyger MMB, Prins C, Smahi A, Trembath RC, Fraternali F, Smith CH, Barker JN, Capon F.** AP1S3 Mutations Are Associated with Pustular Psoriasis and Impaired Toll-like Receptor 3 Trafficking. *Am. J. Hum. Genet.* 2014;94(5):790–797.
245. **Boyadjiev SA, Fromme JC, Ben J, Chong SS, Nauta C, Hur DJ, Zhang G, Hamamoto S, Schekman R, Ravazzola M, Orci L, Eyaid W.** Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a SEC23A mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-Golgi trafficking. *Nat. Genet.* 2006;38:1192.
246. **Gedeon ÁK, Colley A, Jamieson R, Thompson EM, Rogers J, Sillence D, Tiller GE, Mulley JC, Géczi J.** Identification of the gene (SEDL) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Nat. Genet.* 1999;22:400.
247. **Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC.** Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat. Genet.* 2003;34:29.
248. **Ambesi-Impiombato FS, Parks LA, Coon HG.** Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980;77(6):3455–3459.
249. **Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G.** One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 1987;7(9):3365–3370.
250. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72(1–2):248–254.
251. **Hirai A, Nakamura S, Noguchi Y, Yasuda T, Kitagawa M, Tatsuno I, Oeda T, Tahara K, Terano T, Narumiya S, Kohn LD, Saito Y.** Geranylgeranylated Rho Small GTPase(s) Are Essential for the Degradation of p27 Kip1 and Facilitate the Progression from G 1 to S Phase in Growth-stimulated Rat FRTL-5 Cells. *J. Biol. Chem.* 1997;272(1):13–16.
252. **Vélez ML, Costamagna E, Kimura ET, Fozzatti L, Pellizas CG, Montesinos MM, Lucero AM, Coleoni AH, Santisteban P, Masini-Repiso AM.** Bacterial Lipopolysaccharide Stimulates the Thyrotropin-Dependent Thyroglobulin Gene Expression at the Transcriptional Level by Involving the Transcription Factors Thyroid Transcription Factor-1 and Paired Box Domain Transcription Factor 8. *Endocrinology* 2006;147(7):3260–3275.

253. **Costes S V., Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S.** Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophys. J.* 2004;86(6):3993–4003.
254. **Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F.** Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013;8(11):2281–2308.
255. **Doyle JJ, Doyle JL, Doyle JA, Doyle J.** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. In: ; 1990.
256. **Melo US, Macedo-Souza LI, Figueiredo T, Muotri AR, Gleeson JG, Coux G, Armas P, Calcaterra NB, Kitajima JP, Amorim S, Olávio TR, Griesi-Oliveira K, Coatti GC, Rocha CRR, Martins-Pinheiro M, Menck CFM, Zaki MS, Kok F, Zatz M, Santos S.** Overexpression of KLC2 due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24(24):ddv388.
257. **Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF.** Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 1995;203(3):253–310.
258. **Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE.** Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* 2009;238(12):2975–3015.
259. **Rosas MG, Lorenzatti A, Porcel de Peralta MS, Calcaterra NB, Coux G.** Proteasomal inhibition attenuates craniofacial malformations in a zebrafish model of Treacher Collins Syndrome. *Biochem. Pharmacol.* 2019;163(December 2018):362–370.
260. **Gouw M, Michael S, Sámano-Sánchez H, Kumar M, Zeke A, Lang B, Bely B, Chemes LB, Davey NE, Deng Z, Diella F, Gürth C-M, Huber A-K, Kleinsorg S, Schlegel LS, Palopoli N, Roey K V, Altenberg B, Reményi A, Dinkel H, Gibson TJ.** The eukaryotic linear motif resource – 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D428–D434.
261. **Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG.** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 2011;7(1):539.
262. **Notredame C, Higgins DG, Heringa J.** T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 2000;302(1):205–217.
263. **Watanabe A, Choe S, Chaptal V, Rosenberg JM, Wright EM, Grabe M, Abramson J.** The Mechanism of Sodium and Substrate Release from the Binding Pocket of Vsglt. *Nature* 2010;468:988.
264. **Weyand S, Shimamura T, Yajima S, Suzuki S, Mirza O, Krusong K, Carpenter EP, Rutherford NG, Hadden JM, O'Reilly J, Ma P, Saidijam M, Patching SG, Hope RJ, Norbertczak HT, Roach PCJ, Iwata S, Henderson PJF, Cameron AD.** Structure and Molecular Mechanism of a Nucleobase-Cation-Symport-1 Family Transporter. *Science (80-.).* 2008;322:709.
265. **Jia X, Weber E, Tokarev A, Lewinski M, Rizk M, Suarez M, Guatelli J, Xiong Y.** Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1. *Elife* 2014;3:e02362–e02362.
266. **D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, R Harris, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGra DMY and PAK.** *AMBER 2018.* University of California. San Francisco; 2018.
267. **Arcon JP, Defelipe LA, Modenutti CP, López ED, Alvarez-Garcia D, Barril X, Turjanski AG, Martí MA.** Molecular Dynamics in Mixed Solvents Reveals Protein–Ligand Interactions, Improves Docking, and Allows Accurate Binding Free Energy Predictions. *J. Chem. Inf. Model.* 2017;57(4):846–863.
268. **Humphrey W, Dalke A, Schulten K.** VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996;14:33–38.
269. **Lim KYB, Gödde NJ, Humbert PO, Kvensakul M.** Structural basis for the differential interaction of Scribble PDZ domains with the guanine nucleotide exchange factor β -PIX. *J. Biol. Chem.* 2017;292(50):20425–20436.

270. **Alam MS.** Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr. Protoc. Immunol.* 2018;123(1):e58.
271. **García IA, Torres Demichelis V, Viale DL, Di Giusto P, Ezhova Y, Polishchuk RS, Sampieri L, Martinez H, Sztul E, Alvarez C.** CREB3L1-mediated functional and structural adaptation of the secretory pathway in hormone-stimulated thyroid cells. *J. Cell Sci.* 2017;130(24):4155–4167.
272. **Melo US, Macedo-Souza LI, Figueiredo T, Muotri AR, Gleeson JG, Coux G, Armas P, Calcaterra NB, Kitajima JP, Amorim S, Olávio TR, Griesi-Oliveira K, Coatti GC, Rocha CRR, Martins-Pinheiro M, Menck CFM, Zaki MS, Kok F, Zatz M, Santos S.** Overexpression of KLC2 due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2015;24(24):6877–6885.
273. **French AR, Sudlow GP, Wiley HS, Lauffenburger DA.** Postendocytic trafficking of epidermal growth factor-receptor complexes is mediated through saturable and specific endosomal interactions. *J. Biol. Chem.* 1994;269(22):15749–55.
274. **Kornilova E, Sorkina T, Beguinot L, Sorkin A.** Lysosomal Targeting of Epidermal Growth Factor Receptors via a Kinase-dependent Pathway Is Mediated by the Receptor Carboxyl-terminal Residues 1022-1123. *J. Biol. Chem.* 1996;271(48):30340–30346.
275. **Wehrle-Haller B, Imhof BA.** Stem cell factor presentation to c-Kit. Identification of a basolateral targeting domain. *J. Biol. Chem.* 2001;276(16):12667–12674.
276. **Gephart JD, Singh B, Higginbotham JN, Franklin JL, Gonzalez A, Fölsch H, Coffey RJ.** Identification of a Novel Mono-Leucine Basolateral Sorting Motif Within the Cytoplasmic Domain of Amphiregulin. *Traffic* 2011;12(12):1793–1804.
277. **Singh B, Bogatcheva G, Starchenko A, Sinnaeve J, Lapierre LA, Williams JA, Goldenring JR, Coffey RJ.** Induction of lateral lumens through disruption of a monoleucine-based basolateral-sorting motif in betacellulin. *J. Cell Sci.* 2015;128(18):3444–3455.
278. **Zhang X, Riedel C, Carrasco N, Arvan P.** Polarized trafficking of thyrocyte proteins in MDCK cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002;188(1–2):27–36.
279. **Paroder V, Spencer SR, Paroder M, Arango D, Schwartz S, Mariadason JM, Augenlicht LH, Eskandari S, Carrasco N.** Na(+)/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(19):7270–5.
280. **Koumariou P, Gómez-López G, Santisteban P.** Pax8 controls thyroid follicular polarity through cadherin-16. *J. Cell Sci.* 2017;130(1):219–231.
281. **Jia X, Weber E, Tokarev A, Lewinski M, Rizk M, Suarez M, Guatelli J, Xiong Y.** Structural basis of HIV-1 Vpu-mediated BST2 antagonism via hijacking of the clathrin adaptor protein complex 1. *Elife* 2014;2014(3):1–24.
282. **Cazarin J, Andrade B, Carvalho D.** AMP-Activated Protein Kinase Activation Leads to Lysome-Mediated Na⁺/I⁻-Symporter Protein Degradation in Rat Thyroid Cells. *Horm. Metab. Res.* 2014;46(05):313–317.
283. **Lahuna O, Quellari M, Achard C, Nola S, Méduri G, Navarro C, Vitale N, Borg JP, Misrahi M.** Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib-βPIX-GIT1-ARF6 pathway. *EMBO J.* 2005;24(7):1364–1374.
284. **Gujral TS, Karp ES, Chan M, Chang BH, MacBeath G.** Family-wide investigation of PDZ domain-mediated protein-protein interactions implicates β-catenin in maintaining the integrity of tight junctions. *Chem. Biol.* 2013;20(6):816–827.
285. **Kollecker I, von Wasielewski R, Langner C, Müller JA, Spitzweg C, Kreipe H, Brabant G.** Subcellular Distribution of the Sodium Iodide Symporter in Benign and Malignant Thyroid Tissues. *Thyroid* 2012;22(5):529–535.
286. **Wapnir IL, Van De Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, Greco RS, Dohán O, Carrasco N.** Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using

- high density tissue microarrays and conventional sections. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88(4):1880–1888.
287. **Pernigo S, Chegkazi MS, Yip YY, Treacy C, Glorani G, Hansen K, Politis A, Bui S, Dodding MP, Steiner RA.** Structural basis for isoform-specific kinesin-1 recognition of Y-acidic cargo adaptors. *Elife* 2018;7:1–46.
288. **Gravotta D, Deora A, Perret E, Oyanadel C, Soza A, Schreiner R, Gonzalez A, Rodriguez-Boulan E.** AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007;104(5):1564–1569.
289. **Pohlentz J, Refetoff S.** Mutations in the sodium/iodide symporter (NIS) gene as a cause for iodide transport defects and congenital hypothyroidism. *Biochimie* 1999;81(5):469–476.
290. **Stoupa A, Adam F, Kariyawasam D, Strassel C, Gawade S, Szinnai G, Kauskot A, Lasne D, Janke C, Natarajan K, Schmitt A, Bole-Feysot C, Nitschke P, Léger J, Jabot-Hanin F, Tores F, Michel A, Munnich A, Besmond C, Scharfmann R, Lanza F, Borgel D, Polak M, Carré A.** TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology. *EMBO Mol. Med.* 2018;10(12):e9569.
291. **Morfini G.** Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.* 2002;21(3):281–293.
292. **Stagi M, Gorlovoy P, Larionov S, Takahashi K, Neumann H.** Unloading kinesin transported cargoes from the tubulin track via the inflammatory c-Jun N-terminal kinase pathway. *FASEB J.* 2006;20(14):2573–2575.
293. **Vagnoni A, Rodriguez L, Manser C, De Vos KJ, Miller CCJ.** Phosphorylation of kinesin light chain 1 at serine 460 modulates binding and trafficking of calyculin-1. *J. Cell Sci.* 2011;124(7):1032–1042.
294. **Ichimura T, Wakamiya-Tsuruta A, Itagaki C, Taoka M, Hayano T, Natsume T, Isobe T.** Phosphorylation-dependent interaction of kinesin light chain 2 and the 14-3-3 protein. *Biochemistry* 2002;41(17):5566–5572.
295. **Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, Kimura K, Makita H, Sekine M, Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S, Yamamoto J, Saito K, Kawai Y, Isono Y, Nakamura Y, Nagahara K, Murakami K, Yasuda T, Iwayanagi T, Wagatsuma M, Shiratori A, Sudo H, Hosoiri T, Kaku Y, Kodaira H, Kondo H, Sugawara M, Takahashi M, Kanda K, Yokoi T, Furuya T, Kikkawa E, Omura Y, Abe K, Kamihara K, Katsuta N, Sato K, Tanikawa M, Yamazaki M, Ninomiya K, Ishibashi T, Yamashita H, Murakawa K, Fujimori K, Tanai H, Kimata M, Watanabe M, Hiraoka S, Chiba Y, Ishida S, Ono Y, Takiguchi S, Watanabe S, Yosida M, Hotuta T, Kusano J, Kanehori K, Takahashi-Fujii A, Hara H, Tanase T, Nomura Y, Togiya S, Komai F, Hara R, Takeuchi K, Arita M, Imose N, Musashino K, Yuuki H, Oshima A, Sasaki N, Aotsuka S, Yoshikawa Y, Matsunawa H, Ichihara T, Shiohata N, Sano S, Moriya S, Momiyama H, Satoh N, Takami S, Terashima Y, Suzuki O, Nakagawa S, Senoh A, Mizoguchi H, Goto Y, Shimizu F, Wakebe H, Hishigaki H, Watanabe T, Sugiyama A, Takemoto M, Kawakami B, Yamazaki M, Watanabe K, Kumagai A, Itakura S, Fukuzumi Y, Fujimori Y, Komiyama M, Tashiro H, Tanigami A, Fujiwara T, Ono T, Yamada K, Fujii Y, Ozaki K, Hirao M, Ohmori Y, Kawabata A, Hikiji T, Kobatake N, Inagaki H, Ikema Y, Okamoto S, Okitani R, Kawakami T, Noguchi S, Itoh T, Shigeta K, Senba T, Matsumura K, Nakajima Y, Mizuno T, Morinaga M, Sasaki M, Togashi T, Oyama M, Hata H, Watanabe M, Komatsu T, Mizushima-Sugano J, Satoh T, Shirai Y, Takahashi Y, Nakagawa K, Okumura K, Nagase T, Nomura N, Kikuchi H, Masuho Y, Yamashita R, Nakai K, Yada T, Nakamura Y, Ohara O, Isogai T, Sugano S.** Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat. Genet.* 2004;36(1):40–45.
296. **Srebrow A.** The connection between splicing and cancer. *J. Cell Sci.* 2006;119(13):2635–2641.
297. **De La Vieja A, Santisteban P.** Role of iodide metabolism in physiology and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2018;25(4):R225–R245.
298. **Schreiner R, Frindt G, Diaz F, Carvajal-Gonzalez JM, Perez Bay AE, Palmer LG, Marshansky V, Brown D, Philp NJ, Rodriguez-Boulan E.** The absence of a clathrin adapter confers unique polarity essential to proximal tubule function. *Kidney Int.* 2010;78(4):382–388.

299. **Nicola JP, Carrasco N, Masini-Repiso AM.** Dietary I– Absorption. In: *Vitamins & Hormones*. Vol 98. Academic Press; 2015:1–31.
300. **Riesco-Eizaguirre G, Rodríguez I, De La Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, Santisteban P.** The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor β secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res.* 2009;69(21):8317–8325.
301. **Traub LM, Kornfeld S.** The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9(4):527–533.
302. **Conner SD, Schmid SL.** Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 2002;156(5):921 LP – 929.
303. **Zhang CX, Engqvist-Goldstein ÅEY, Carreno S, Owen DJ, Smythe E, Drubin DG.** Multiple Roles for Cyclin G-Associated Kinase in Clathrin-Mediated Sorting Events. *Traffic* 2005;6(12):1103–1113.
304. **Beacham GM, Partlow EA, Hollopeter G.** Conformational regulation of AP1 and AP2 clathrin adaptor complexes. *Traffic* 2019;(July):1–11.
305. **Bilder D, Perrimon N.** Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 2000;403(6770):676–680.
306. **Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, Allred C, Muthuswamy SK.** Dereglulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell* 2008;135(5):865–78.
307. **Dow LE, Brumby AM, Muratore R, Coombe ML, Sedelies KA, Trapani JA, Russell SM, Richardson HE, Humbert PO.** hScrib is a functional homologue of the Drosophila tumour suppressor Scribble. *Oncogene* 2003;22(58):9225–9230.
308. **Pagliarini RA.** A Genetic Screen in Drosophila for Metastatic Behavior. *Science (80-.).* 2003;302(5648):1227–1231.
309. **Lohia M, Qin Y, Macara IG.** The Scribble Polarity Protein Stabilizes E-Cadherin/p120-Catenin Binding and Blocks Retrieval of E-Cadherin to the Golgi. *PLoS One* 2012;7(11):e51130.
310. **Norman M, Wisniewska KA, Lawrenson K, Garcia-Miranda P, Tada M, Kajita M, Mano H, Ishikawa S, Ikegawa M, Shimada T, Fujita Y.** Loss of Scribble causes cell competition in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 2012;125(1):59 LP – 66.
311. **Pearson HB, Perez-Mancera PA, Dow LE, Ryan A, Tennstedt P, Bogani D, Elsum I, Greenfield A, Tuveson DA, Simon R, Humbert PO.** SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *J. Clin. Invest.* 2011;121(11):4257–4267.
312. **Gardiol D, Zacchi A, Petrerá F, Stanta G, Banks L.** Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression. *Int. J. Cancer* 2006;119(6):1285–1290.
313. **Navarro C, Nola S, Audebert S, Santoni M-J, Arsanto J-P, Ginestier C, Marchetto S, Jacquemier J, Isnardon D, Le Bivic A, Birnbaum D, Borg J-P.** Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 2005;24(27):4330–4339.
314. **Feigin ME, Akshinthala SD, Araki K, Rosenberg AZ, Muthuswamy LB, Martin B, Lehmann BD, Berman HK, Pietenpol JA, Cardiff RD, Muthuswamy SK.** Mislocalization of the Cell Polarity Protein Scribble Promotes Mammary Tumorigenesis and Is Associated with Basal Breast Cancer. *Cancer Res.* 2014;74(11):3180 LP – 3194.
315. **Elsum IA, Humbert PO.** Localization, Not Important in All Tumor-Suppressing Properties: A Lesson Learnt from Scribble. *Cells Tissues Organs* 2013;198(1):1–11.
316. **Anastas JN, Biechele TL, Robitaille M, Muster J, Allison KH, Angers S, Moon RT.** A protein complex of SCRIB,

- NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression. *Oncogene* 2012;31(32):3696–3708.
317. **Nagasaka K, Pim D, Massimi P, Thomas M, Tomać V, Subbaiah VK, Kranjec C, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Myers M, Banks L.** The cell polarity regulator hScrib controls ERK activation through a KIM site-dependent interaction. *Oncogene* 2010;29(38):5311–5321.
318. **Elsun IA, Martin C, Humbert PO.** Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation. *J. Cell Sci.* 2013;126(17):3990 LP – 3999.
319. **Sundell GN, Vögeli B, Ivarsson Y, Chi CN.** The Sign of Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift Difference as a Determinant of the Origin of Binding Selectivity: Elucidation of the Position Dependence of Phosphorylation in Ligands Binding to Scribble PDZ1. *Biochemistry* 2018;57(1):66–71.
320. **Hernandez JL, Davda D, Cheung See Kit M, Majmudar JD, Won SJ, Gang M, Pasupuleti SC, Choi AI, Bartkowiak CM, Martin BR.** APT2 Inhibition Restores Scribble Localization and S-Palmitoylation in Snail-Transformed Cells. *Cell Chem. Biol.* 2017;24(1):87–97.
321. **Chen B, Zheng B, DeRan M, Jarugumilli GK, Fu J, Brooks YS, Wu X.** ZDHHC7-mediated S-palmitoylation of Scribble regulates cell polarity. *Nat. Chem. Biol.* 2016;12(9):686–693.
322. **Daniotti JL, Pedro MP, Valdez Taubas J.** The role of S-acylation in protein trafficking. *Traffic* 2017;18(11):699–710.
323. **Ko P-J, Dixon SJ.** Protein palmitoylation and cancer. *EMBO Rep.* 2018;19(10):e46666.
324. **Smith VE, Sharma N, Watkins RJ, Read ML, Ryan GA, Kwan PP, Martin A, Watkinson JC, Boelaert K, Franklyn JA, McCabe CJ.** Manipulation of PBF/PTTG1P phosphorylation status; a potential new therapeutic strategy for improving radioiodine uptake in thyroid and other tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(7):2876–2886.
325. **Wang J, Fresquez T, Kandachar V, Deretic D.** The Arf GEF GBF1 and Arf4 synergize with the sensory receptor cargo, rhodopsin, to regulate ciliary membrane trafficking. *J. Cell Sci.* 2017;130(23):3975–3987.
326. **Stamnes MA, Rothman JE.** The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* 1993;73(5):999–1005.
327. **Lee I, Doray B, Govero J, Kornfeld S.** Binding of cargo sorting signals to AP-1 enhances its association with ADP ribosylation factor 1–GTP. *J. Cell Biol.* 2008;180(3):467–472.
328. **Wapnir IL, Goris M, Yudd A, Dohan O, Adelman D, Nowels K, Carrasco N.** The Na⁺/I⁻ symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(13):4294–4302.
329. **Hyuk Moon D, Jin Lee S, Young Park K, Ku Park K, Hyun Ahn S, Sun Pai M, Chang H, Kyung Lee H, Ahn I-M.** Correlation between 99m Tc-pertechnetate uptakes and expressions of human sodium iodide symporter gene in breast tumor tissues. *Nucl. Med. Biol.* 2001;28(7):829–834.
330. **Thompson RJ, Fletcher A, Brookes K, Nieto H, Alshahrani MM, Mueller JW, Fine NHF, Hodson DJ, Boelaert K, Read ML, Smith VE, McCabe CJ.** Dimerization of the Sodium/Iodide Symporter. *Thyroid* 2019:1–38.
331. **Chung T, Youn H, Yeom CJ, Kang KW, Chung JK.** Glycosylation of sodium/iodide symporter (NIS) regulates its membrane translocation and radioiodine uptake. *PLoS One* 2015;10(11):1–14.
332. **Rathod M, Chatterjee S, Dutta S, Kalraiya R, Bhattacharya D, De A.** Mannose glycosylation is an integral step for human NIS localization and function in breast cancer cells. *J. Cell Sci.* 2019;(August):jcs.232058.
333. **Hamel LD, Lenhart BJ, Mitchell DA, Santos RG, Giulianotti MA, Deschenes RJ.** Identification of Protein Palmitoylation Inhibitors from a Scaffold Ranking Library. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2016;19(4):262–274.

334. **Nicola J, Masini-Repiso A.** Emerging Therapeutics for Radioiodide-Refractory Thyroid Cancer. *J Anal Oncol.* 2016;5:75-86.

8. Abreviaturas

3' UTR: Región 3' no traducida	ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares
ADN: Ácido desoxirribonucleico	FRET: Transferencia de la Energía Resonante de Förster
ADNc: ADN complementario	FRTL5: Línea celular de tiroides de rata Fisher – clon 5
AMPc o cAMP: Adenosina monofosfato cíclico	FRT: Línea celular de tiroides de rata Fisher
ARN: Ácido ribonucleico	FSH: hormona folículo estimulante
ARNm: ARN mensajero	GC: gonadotropina coriónica
ATP: adenosina trifosfato	GFP: proteína fluorescente verde
AP: proteína adaptadora asociada a clatrina	GGA: proteínas ARF que contienen orejas y se localizan en Golgi
ARE: endosomas apicales de reciclado	GIT1: proteína activadora de ARF GTPasas
ARF: proteína factor de ribosilación	GPI: glicosilfosfatidilinositol
ASE: endosomas de selección apical	HA: hemaglutinina
βPIX: factor beta interactivo de PAX	HBSS: Solución salina balanceada de Hank
BRAF: Transductor perteneciente a la familia de proteínas RAF	hps: horas pos-fecundación
BSA: Albúmina sérica bovina	ID: identificador
BSE: endosomas de selección basolateral	ITD: Defecto en el transporte de yoduro
CFTR: proteína transmembrana reguladora de la conductancia de la fibrosis quística.	IP: Inmunoprecipitación
CGN: red cis-Golgi	KCNQ1: proteína que forma parte del canal de potasio.
CMTB1: proteína mielina abundante en periferia	KCNE2: proteína miembro 2 de la subfamilia 5 de canales de potasio.
cRE: Elemento de respuesta a AMPc	kDa: kilo Dalton
CRE: endosomas comunes de reciclado	KHC: cadena pesada de la kinesina-1
CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc	KIF: superfamilia de proteínas kinesina
D1: Deshalogenasa o deiodasa de iodotironinas tipo 1	KLC: Cadena liviana de kinesina-1
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole	Lgl: proteína letal de Larva gigante
DIT: Diiodotirosina	LH: hormona luteinizante
DEHAL: Deshalogenasa o deiodasa de iodotirosinas	LRR: repeticiones ricas en leucina
Dlg: proteína disco grande	MAPK: Kinasa activada por mitógenos
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco	MDCK-II: línea celular de riñón de perro de Madin-Cadney
DMSO: dimetilsulfóxido	HEK293T: línea celular de riñón humano embrionario
dps: días pos-fecundación	MEK: acrónimo de MAPK/ERK
DTT: Ditiotreitól	MIT: Monoiodotirosina
DUOX: Oxidasa tiroidea dependiente de NADPH	Mhp1: transportador de benzil/hidantoina de <i>Microbacterium liquefaciens</i>
ENaC: canal de sodio epitelial	
ERES: sitio de salida del retículo endoplásmico	
ERGIC: compartimento intermedio entre retículo endoplásmico y Golgi	

NHERF: regulador del antiportador de sodio-hidrógeno

NIS: Simportador de Na⁺/I⁻

p76RBE: proteína simil rhofilina

PAGE: Electroforesis en gel de Poliacrilamida

PAM: motivo adyacente al protoespaciador

Pax8: Factor de transcripción Pax8

pb: Pares de bases

PBF: factor de interacción con el gen transformante tumoral pituitario

PBS: Solución buffer fosfato

PCCI3: Línea celular de tiroides de rata Fisher, PC clon 3

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: protein data bank

PDS: Pendrina

PDZ: acrónimo de proteína post sináptica, proteína Disc de *Drosophila* y proteína ZO-1 de uniones estrechas.

PIGU: subunidad clase U de anclamiento y biosíntesis de fosfatidilinositol glicano.

PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc

PLA: ensayo de ligación por proximidad

PNK: proteína quinasa de nucleótidos

Proteína G: Proteína de unión a nucleótidos de guanina

PTC: Cáncer papilar tiroideo

RT: Transcripción reversa

RAS: Transductor perteneciente a la familia de proteínas RAS

Rab GTPasas: superfamilia monomérica GTPasa relacionada a RAS

RE: retículo endoplásmico

SCRIB: proteína homóloga a Scribbled (*Drosophila*)

SDS: Dodecil sulfato de sodio

shARN: ARN de horquilla corta

SMCT: transportador de Na⁺/monocaboxilatos

T3: 3, 5, 3'-triiodotironina

T4: 3, 5, 3', 5'-tetraiodotironina o Tiroxina

TAZ: tafazina

TBS: Solución buffer tris-salino

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TG: Tiroglobulina

TGN: red trans-Golgi

TPO: Peroxidasa tiroidea

TPR: repetición tricopéptido

TRH: Hormona liberadora de tiotropina

TSH: Hormona estimulante de tiroides o tiotropina

TSHR: Receptor de TSH

THOX: Oxidasa tiroidea

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo-1

TTF-2: Factor de transcripción tiroideo-2

rT3: 3,3',5' triiodotironina

SLiMs: motivos cortos lineales de aminoácidos

UA: uniones adherentes

UE: uniones estrechas

VCP: proteína que contiene valosina

Vpu: proteína viral u de HIV-1

vSGLT: cotransportador de sodio/galactosa de *Vibrio parahaemolyticus*

WB: western blot

9. Publicaciones

9.1 Publicaciones relacionadas al presente trabajo de tesis

Martín M*, Bernal-Barquero CE*, Geysels RC, Papendieck P, Peyret V, Masini-Repiso AM, Chiesa AE and Nicola JP. "Novel Sodium/Iodide Symporter Compound Heterozygous Pathogenic Variants Causing Dyshormonogenic Congenital Hypothyroidism". *Thyroid*. doi: 10.1089/thy.2019.0046. *Igual contribución.

Martín M, Geysels RC, Peyret V, Masini-Repiso AM, Nicola JP. "Na⁺/I⁻ Symporter (NIS) Transport to the Plasma Membrane: Implications for Thyroid Physiology and Pathology". *Journal of the Endocrine Society*. 3(1):222-234.

Martín M, Modenutti CP, Peyret V, Geysels R, Darrouzet E, Pourcher T, Masini-Repiso AM, Martí MA, Carrasco N and Nicola JP. "A Carboxy-Terminal Monoleucine-Based Motif Participates in the Basolateral Targeting of the Na⁺/I⁻ Symporter (NIS)". *Endocrinology*. 160(1):156-168.

Martín M and Nicola JP "Congenital iodide transport defect: recent advances and future perspectives". *J Clin Mol Endocrinol*. 1(2):09.

9.2 Publicaciones como co-autor durante el transcurso de esta tesis

Peyret V, Nazar M, **Martín M**, Quintar AA, Fernandez EA, Fuziwara FS, Geysels R, Montesinos MM, Maldonado CA, Santisteban P, Kimura ET, Pellizas CG, Nicola JP and Masini-Repiso AM. "Papillary thyroid cancer-driving oncogenes induce aberrant Toll-like receptor 4 expression". *Molecular Cancer Research*. 16(5):833-845.

Geysels RC*, Peyret V*, **Martín M**, Nazar M, Reale C, Bernal-Barquero CE, Miranda L, Martí MA, Vito P, Masini-Repiso AM and Nicola JP. "The transcription factor NF- κ B mediates thyrotropin-stimulated expression of thyroid differentiation markers". *Thyroid*. Aceptado para publicación.

10. Agradecimientos

Este trabajo de tesis ha sido fruto del esfuerzo conjunto, en una u otra forma, de muchas personas a quienes les estoy y estaré eternamente agradecido.

A Juan por darme el espacio y los medios para poder realizar mi tesis doctoral. Por sus enseñanzas, críticas, discusiones, por saber considerar mis ideas y darme rienda suelta para que las desarrolle.

Al Estado Argentino en toda su extensión institucional (Universidad Pública, CONICET y demás instituciones) por darme la oportunidad de seguirme formando.

A Nancy Carrasco por sus enseñanzas y sugerencias, y por la oportunidad de realizar una pasantía en su laboratorio. A Marcelo Martí (Marce) y Carlos Modenutti (Mode) por sus aportes a esta tesis en el campo del modelado molecular y la bioinformática. A Gabriel Coux (Gabi), Nora Caltaerra y Mauco Rosas por sus aportes a esta tesis en el manejo de peces zebra. Al equipo de trabajo de la Dra. Mirta Miras y de la Dra. Ana Chiesa, por estrecharnos una mano desde la clínica.

A la gente del laboratorio 116 (Caro, Moni, Lauri, Ana, Flor, Ro, Romi, Vicky, Mari, Claudia, Dana y Edu) por sus aportes y el acompañamiento día a día.

A todo el personal del CIBICI y de la FCQ en su conjunto. En especial a las CPAs dispuestas a dar una mano.

A mis compañeros y amigos del instituto que me acompañaron a lo largo de estos 4 años y con los cuales hemos compartido largas y tendidas horas de trabajo y disfrute.

A mis amigos de siempre y de toda la vida, que han sabido comprender y acompañarme a lo largo de este proceso.

A mis viejos y a mi hermana que siempre están presentes. Por su apoyo y acompañamiento incondicional. A mi familia en su extensión que de una manera u otra me han acompañado en estos años.

A Milite que me acompaña día a día. Por su paciencia, comprensión y amor.

A la Pupi que con su amor perruno nos alegra cotidianamente.

A la vida por darme estas oportunidades.

Gracias!!