

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Función de los dímeros $G\beta\gamma$ y de la proteína
neuronal DARPP-32 en la diferenciación
celular tiroidea

Miguel Angel Zaballos Sánchez

Madrid, 2008

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Función de los dímeros $G\beta\gamma$ y de la proteína neuronal
DARPP-32 en la diferenciación
celular tiroidea

Memoria presentada por Miguel Angel Zaballos Sánchez, licenciado en Biología para optar al grado de Doctor

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” bajo la dirección de la Dra. Pilar Santisteban Sanz y de la Dra. Custodia García Jiménez

Resumen

El fenotipo diferenciado de la célula epitelial tiroidea está definido por la expresión conjunta del simportador de Na^+/I^- , de la tiroglobulina, de la tiroperoxidasa y del receptor de tirotropina, que son fundamentales para la síntesis y secreción de hormonas tiroideas. La expresión de estos genes en tejido tiroideo es posible gracias a la acción coordinada de los factores de transcripción TTF-1, FoxE1 y Pax8. El estado diferenciado de la célula está controlado por la hormona hipofisaria tirotropina o TSH, que tras activar a su receptor acoplado a proteínas G, induce la expresión de los genes marcadores de la diferenciación tiroidea a través de la vía de $\text{G}\alpha\text{s}/\text{cAMP}/\text{PKA}$. La activación de $\text{G}\alpha\text{s}$ promueve la liberación del complejo $\text{G}\beta\gamma$ asociado, cuyos efectos sobre las células tiroideas se desconocen. En este trabajo de tesis doctoral se describe una nueva ruta de señalización, desencadenada por los dímeros $\text{G}\beta\gamma$ liberados tras la unión de la TSH a su receptor, que promueve la activación de la vía de la PI3K por un mecanismo independiente de cAMP, y que contrarresta el aumento de la expresión de NIS inducido por la activación de $\text{G}\alpha\text{s}$. Este efecto es ejercido a nivel transcripcional, afectando al factor de transcripción Pax8, que es excluido del núcleo, reduciendo su unión al promotor de *NIS*. A pesar del papel protagonista de la TSH en el control de la diferenciación tiroidea, otros factores se han implicado en este proceso, siendo el factor de crecimiento IGF-1 el más relevante. Distintas evidencias sugieren la existencia de una señalización cruzada entre las vías activadas por ambos factores en tiroides. En la segunda parte de este trabajo, se describe por primera vez la presencia de la proteína neuronal DARPP-32 en tejido tiroideo. Esta proteína desempeña un papel fundamental en algunas regiones del cerebro, integrando las señales provenientes de distintos receptores de membrana. La función de esta proteína está determinada por su capacidad de inhibir alternativamente a la fosfatasa PP1 o a la kinasa PKA, en función de su estado de fosforilación. En este trabajo se ha relacionado la expresión de esta proteína con el proceso de diferenciación de células tiroideas. Los niveles de DARPP-32 desaparecen o están bruscamente reducidos en células no diferenciadas. TSH e IGF-1, estimulan tanto su expresión como su fosforilación en el residuo Thr34 a través de las vías de cAMP y PI3K, lo que dirige su actividad hacia la inhibición de la PP1. Además, la eliminación de la proteína en células tiroideas diferenciadas, promueve la pérdida de expresión de los marcadores de la diferenciación tiroidea, y por el contrario, su expresión en células transformadas, revierte su fenotipo no diferenciado.

Summary

The expression of the Na⁺/I⁻ symporter, thyroglobulin, thyroperoxidase and the thyrotropin receptor are the hallmarks of the thyroid differentiated phenotype. These proteins are needed for the thyroid cells to accomplish their function, i.e. synthesis and secretion of the thyroid hormones. The expression of these genes in thyroid tissue is possible due to the coordinated action of the TTF-1, FoxE1 and Pax8 transcription factors. The differentiation state of the cell, and therefore its function, is mainly regulated by the TSH hormone that transmits its signal through its G-protein coupled receptor. Upon TSHR activation, the release of G α s subunits is triggered, inducing the activation of several effectors, such as PKA, that finally leads to the expression of the thyroid differentiation markers. G α s activation promotes the release of the associated G $\beta\gamma$ complex. Although many G $\beta\gamma$ effectors have been so far described, the signaling triggered by G $\beta\gamma$ in the thyroid is essentially unknown. In this work, we describe a new signaling pathway activated by G $\beta\gamma$ release upon TSH binding to its receptor. G $\beta\gamma$ release promotes PI3K activation by a cAMP-independent mechanism, opposing to the G α s-induced NIS expression. G $\beta\gamma$ -mediated decrease in NIS expression takes place at the transcriptional level, involving Pax8 transcription factor that is excluded from the nucleus, decreasing its binding to the *NIS* promoter. Despite of the main role of TSH in the control of thyroid cells differentiation, other factors have been implicated in this process, being IGF-1 the most relevant. Different evidences point to the existence of a crosstalk between the pathways activated by both factors in the thyroid. In the second part of this work, we describe for the first time the expression of the neuronal protein DARPP-32 in thyroid tissue. This protein plays a key role mediating the signals elicited by different membrane receptors in specific brain regions. DARPP-32 function is determined by its ability to alternatively inhibit the PP1 phosphatase or the PKA kinase, depending on its phosphorylation state. In this work we demonstrate that DARPP-32 expression is related to the thyroid cells differentiation process. DARPP-32 expression is lost or strongly reduced in undifferentiated thyroid cells. Both TSH and IGF-1 induce DARPP-32 expression, and its phosphorylation in the Thr34 residue, through the PKA and PI3K pathways, driving its function to PP1 inhibition. Moreover, DARPP-32 depletion in thyroid differentiated cells induces the loss of expression of the thyroid differentiation markers, and conversely, DARPP-32 re-expression in Ras-transformed thyroid cells, reverts their undifferentiated phenotype.

INDICE	1
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCION	9
1. La célula epitelial tiroidea	10
2. Receptores acoplados a proteínas G. El receptor de TSH	14
2.1 TSH.....	14
2.2 GPCRs.....	14
2.3 TSHR.....	15
3. Proteínas G heterotriméricas	16
3.1 Familias de proteínas G heterotriméricas.....	17
3.1.1 <i>Gs</i>	18
3.1.2 <i>Gi/Go</i>	19
3.1.3 <i>Gq/G11</i>	19
3.1.4 <i>G12/G13</i>	19
3.2 El complejo Gβγ	20
3.3 Proteínas G que se acoplan al TSHR	21
3.4 Mecanismo de transmisión de la señal a través de GPCRs.....	22
4. Vías de señalización activadas por TSH	24
4.1 Activación a través de <i>Gs</i>	24
4.1.1 <i>Adenilato ciclasa</i>	24
4.1.2 <i>cAMP</i> y <i>PKA</i>	25
4.1.3 <i>Otros efectores del cAMP</i>	25
4.1.4 <i>CREB</i>	26
4.2 Señalización cruzada.....	26
5. Insulina/IGF-1 y PI3K	27
5.1 PI3K.....	27

5.1.1 Clases de PI3Ks.....	27
5.1.2 Efectores de PI3Ks de la clase IA.....	29
5.2 Acción de IGF-1 sobre la transcripción génica en tiroides.....	30
6. DARPP-32.....	31
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y METODOS.....	36
1. Materiales.....	37
1.1 Líneas celulares.....	37
1.2 Productos.....	37
1.3 Plásmidos.....	38
1.4 Oligonucleótidos.....	40
1.4.1 Transcripción reversa y amplificación por PCR (RT-PCR).....	40
1.4.2 Ensayos de retardo en gel (EMSA).....	40
1.4.3 Generación del vector de expresión del RNA de interferencia de DARPP-32.....	41
1.4.4 RNA de interferencia para eliminar la expresión de DARPP-32 y oligonucleótidos control.....	41
1.5 Medios instrumentales.....	41
2. Métodos.....	42
2.1 Cultivos celulares.....	42
2.2 Transfecciones.....	44
2.2.1 Transfecciones de vectores de expresión de siRNA y de oligorribonucleótidos de interferencia.....	44
2.2.2 Transfecciones para evaluar la actividad de promotores.....	44
2.2.3 Transfecciones para ensayos de Western-blot.....	45
2.3 Métodos de detección de mRNA.....	45
2.3.1 Extracción del RNA.....	45

2.3.2 Northern-blot.....	45
2.3.3 RT-PCR.....	46
2.4 Métodos de detección de proteínas.....	46
2.4.1 Western-blot.....	46
2.4.2 Inmunofluorescencia indirecta.....	47
2.4.3 Ensayo de retardo en gel (EMSA).....	48
2.5 Citometría de flujo.....	49
2.6 Medida de cAMP.....	49
2.7 Análisis estadístico.....	50
Resultados.....	51
1. Función de los dímeros Gβγ en la diferenciación celular tiroidea.....	52
1.1 La expresión de complejos Gβ1γ2 disminuye la expresión de NIS en células tiroideas.....	52
1.2 La inhibición de la señal Gβγ endógena aumenta la expresión de NIS inducida por TSH.....	55
1.3 Los complejos Gβγ responsables de la reducción de la expresión de NIS son liberados tras la activación de proteínas Gs.....	57
1.4 La inhibición de la señal Gβγ endógena no aumenta la expresión de Tiroglobulina (Tg) en respuesta a TSH.....	59
1.5 Los complejos Gβγ no alteran los niveles intracelulares de cAMP.....	60
1.6 La TSH promueve la activación de la vía de la PI3K.....	61
1.7 La activación de la PI3K inducida por TSH no está mediada por cAMP.....	64
1.8 La liberación de complejos Gβγ inducida por TSH promueve la activación de la vía de la PI3K.....	65

1.9 La señal mediada por Gβγ promueve la disminución de la capacidad de unión de Pax8 al promotor de <i>NIS</i> y aumenta su localización extranuclear	66
2. Función de DARPP-32 en la diferenciación celular tiroidea.....	71
2.1 DARPP-32 se expresa en células tiroideas.....	71
2.2 La expresión de DARPP-32 se relaciona con el grado de diferenciación celular tiroidea.....	72
2.3 La pérdida de expresión de DARPP-32 provoca la pérdida de diferenciación de células tiroideas.....	74
2.4 La expresión de DARPP-32 en células transformadas con Ras recupera su fenotipo diferenciado.....	77
2.5 TSH e IGF-1 controlan la expresión de DARPP-32.....	78
2.6 Las vías de la PKA y de la PI3K están implicadas en el control de la expresión de DARPP-32 en respuesta a TSH e IGF-1.....	79
2.7 Tanto la TSH como el IGF-1 inducen la fosforilación de DARPP-32 en el residuo de Thr34.....	80
CONCLUSIONES.....	83
DISCUSION.....	84
1. Función de los dímeros Gβγ en la diferenciación celular tiroidea dependiente de TSH.....	85
2. Función de DARPP-32 en la diferenciación celular tiroidea.....	92
BIBLIOGRAFIA.....	97
ANEXO.....	119

Abreviaturas

A

AC: Adenilato ciclasa

AKAP110: Proteína de anclaje a PKA, 110kDa

AMPA: Acido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

ARNO: Proteína abridora del sitio de unión a nucleótido de ARF

A1: Receptor de adenosina tipo A1

A2A: Receptor de adenosina tipo A2A

B

BAD: Antagonista de Bcl-2/Bcl-XL, que provoca muerte celular

β ARK1: Kinasa del receptor β -adrenérgico-1

Bcl-XL: Proteína extragrande de células de linfoma B

Bcl-2: Proteína de células de linfoma B tipo 2

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

B-Raf: Homólogo B1 del oncogén v-raf del virus del sarcoma murino

Btk: Tirosina kinasa de Bruton

C

cAMP: AMP cíclico

cAMP-GEF/Epac: Proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina activadas por cAMP

CDK5: Kinasa dependiente de ciclina-5

CD8: Receptor de linfocitos CD8

CK1: Caseína kinasa-1

CK2: Caseína kinasa-2

CRE: Elemento de respuesta a cAMP

CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP

CRE-L: Similar al elemento de respuesta a cAMP

CTX: Toxina colérica

D

δ : Receptor de opiáceos δ

DARPP-32: Fosfoproteína regulada por dopamina y cAMP, 32kDa

DUOX: Oxidasa dual

D1: Receptor de dopamina D1

D2: Receptor de dopamina D2

E

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ERK: Kinasa regulada extracelularmente

F

FoxE1: "Forkhead box E1"

FoxO: "Forkhead box O"

FRO: Línea celular derivada de un carcinoma anaplásico tiroideo

FRT: Células tiroideas de ratas Fischer

FRTL-5: "Fischer rat thyroid low serum 5%"

FSH: Hormona estimulante del folículo

G

GABA: Acido γ -aminobutírico

GAP: Proteína activadora de actividad GTPasa

Gap1m: Proteína activadora de actividad GTPasa de Ras 2

G α T: Subunidad G α de Transducina

GEF: Factor de intercambio de GDP

GIRK: Canales de K⁺ rectificadores internos activados por proteínas G

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

Grb2: Proteína asociada a receptores de factores de crecimiento 2

GRK: Kinasa regulada por proteínas G

GRP1: Receptor general de fosfoinosítidos 1

GSK3: Kinasa de la glucógeno sintetasa-3

H

Hax-1: Proteína X-1 asociada a HLSC1

hCG: Hormona gonadotrópica coriónica

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

hrTSH: Hormona estimulante del tiroides humana recombinante

Hsp90: Proteína de choque térmico, 90kDa

I

IBMX: 3-isobutil-1-metil-xantina

IGF-1: Factor de crecimiento similar a insulina-1

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento similar a insulina-1

I κ K: Kinasa del inhibidor de κ B

IRS-1: Sustrato del receptor de insulina-1

L

LARG: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Rho asociado a leucemia

LH: Hormona luteinizante

LRR: Repeticiones ricas en leucina

LSD: Dietilamida del ácido lisérgico

M

μ : Receptor de opiáceos μ
 MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos
 MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1
 mTOR: Diana de rapamicina de mamíferos
 M1: Receptor muscarínico de acetilcolina-M1

N

NF- κ B: Factor nuclear- κ B
 NMDA: N-metil-D-aspartato
 NR1: Subunidad del receptor de NMDA-1
 NTF-1: Factor de respuesta a TSH de NIS-1
 NUE: “NIS upstream enhancer”

P

PA: Sitio PA de unión de Pax8 a la región NUE del promotor de NIS
 Pax8: “Paired box8”
 PB: Sitio PB de unión de Pax8 a la región NUE del promotor de NIS
 PCP: 1-(1-fenil-ciclohexil)-piperidina
 PCP γ : Antígeno T mediano del virus del poliovirus
 PDE4: Fosfodiesterasa 4
 PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
 PDK1: Kinasa dependiente de 3'-fosfoinosítidos-1
 PDZ-RhoGEF: Factor de intercambio de nucleótidos de GTP de Rho con dominio PDZ
 PH: Dominio homólogo de pleckstrina
 PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
 PIP3/PtdIns(3)P: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
 PI3K: Fosfatidilinositol 3'-kinasa
 PKA: Proteína kinasa dependiente de cAMP
 PKB/Akt: Proteína kinasa B
 PKC: Proteína kinasa C
 PLC β : Fosfolipasa C β
 PLC γ 2: Fosfolipasa C γ 2
 PLD: Fosfolipasa D
 PP: Promotor proximal
 PP1: Proteína fosfatasa-1
 PP2A: Proteína fosfatasa-2A
 PP2B: Proteína fosfatasa-2B
 PP5: Proteína fosfatasa-5
 Proteína G: Proteína de unión a nucleótidos de guanina
 PtdIns: Fosfatidilinositol
 PTEN: Fosfatasa y homólogo de tensina deletado en el cromosoma 10
 PTX: Toxina pertúxica
 p27^{KIP}: Proteína inhibidora de CDKs
 p35: Proteína reguladora de CDK5
 p115-RhoGEF: Factor de intercambio de GTP de Rho, 115kDa

p300: Proteína de unión a E1A

R

Raf-1: Homólogo 1 del oncogén v-raf del virus del sarcoma murino

Rap1: Proteína próxima a Ras-1

Rap1GAP: Proteína GTPasa activadora de Rap1

Rap2: Proteína próxima a Ras-2

Rat1: Línea de fibroblastos de rata

RGS: Reguladores de la señalización de proteínas G

RhoA: Proteína homóloga de Ras-A

Rictor: Acompañante de mTOR insensible a rapamicina

Rp-cAMP: Isómero Rp de cAMP

rNIS: Simportador de Na⁺/I de rata.

S

sAC: Adenilato ciclasa soluble

Shc: Proteína con dominio SH2

SH2: Dominio de homología con Src-2

SMCT: Transportador de Na⁺/monocarboxilato

Sos1: "Son of sevenless-1"

Sp1: Factor de transcripción Sp1

T

TA: Sitio A de unión de TTF-1 a la región NUE del promotor de NIS

TB: Sitio B de unión de TTF-1 a la región NUE del promotor de NIS

Tg: Tiroglobulina

Tiam-1: Proteína de invasión y metástasis de linfoma de células T-1

TPO: Tiroperoxidasa

TSH: Hormona estimulante del tiroides

TSHR: Receptor de la hormona estimulante del tiroides

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo-1

T₃: Triyodotironina

T₄: Tiroxina

5HT_{4/6/7}: Receptor de serotonina 4/6/7

Introducción

1. La célula epitelial tiroidea

El tiroides es una de las glándulas endocrinas de mayor tamaño, posee una estructura formada por dos lóbulos situados en el cuello a ambos lados de la tráquea, unidos por un istmo que cruza la tráquea anteriormente por debajo del cartílago cricoides (Fig. 1A). La glándula tiroidea está formada principalmente por dos poblaciones celulares de diferente origen embrionario: Las células epiteliales tiroideas o tirocitos, procedentes del endodermo, que se agrupan alrededor de un lumen dando lugar a estructuras foliculares (Fig. 1B), y las células C, que proceden de la cresta neural y se hallan intercaladas entre las células epiteliales. La función de las células C es la de producir la hormona calcitonina, que controla los niveles de calcio en la sangre, mientras que las células epiteliales se encargan de la síntesis y secreción de hormonas tiroideas: 3,5,3'-triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), que regulan la tasa metabólica, el desarrollo cerebral y afectan al crecimiento y función de muchos otros sistemas del organismo.

La característica básica de la célula epitelial tiroidea, que confiere al tiroides una función única dentro del organismo, es la capacidad de incorporar yoduro (I^-) activamente. Esta captación de I^- es realizada a través del simportador de Na^+/I^- (NIS) (Dai, 1996). Una vez dentro de la célula, el I^- es transportado hasta las inmediaciones de la membrana apical, donde es exportado hasta el lumen del folículo mediante un mecanismo aún por definir. Se han identificado varios transportadores en la membrana apical, como el transportador de sodio/monocarboxilato (SMCT) que aunque presenta un 70% de homología con NIS, finalmente se demostró que no es capaz de transportar I^- (Paroder, 2006), o el transportador Pendrina que sí tiene la capacidad de transportar I^- aunque a concentraciones que raramente se dan en la célula tiroidea (Yoshida, 2004). Una vez en el lumen el I^- es oxidado por la enzima tiroperoxidasa (TPO) utilizando H_2O_2 como sustrato, que es generado por un sistema con actividad NADPH oxidasa del que se han identificado dos proteínas: Oxidasa dual (DUOX) 1 y 2 (De Deken, 2002). Posteriormente el I^- es incorporado en residuos específicos de Tyr de la proteína tiroglobulina (Tg), molécula que constituye la fracción proteica mayoritaria del tiroides (Degroot, 1977). La Tg es la proteína precursora de las hormonas tiroideas y es sintetizada y secretada al lumen del folículo por las células epiteliales tiroideas, donde se acumula formando hasta el 80% del coloide del folículo. Una vez yodada, la Tg almacenada es endocitada por la célula mediante un proceso de pinocitosis (Bernier-Valentin, 1991), formando gotas de coloide en el citoplasma que son hidrolizadas por las enzimas lisosomales, dando lugar a las hormonas tiroideas T_3 y T_4 que, tras un proceso de desyodación que genera una fracción más amplia de la hormona fisiológicamente activa T_3 (Laurberg, 1984), son finalmente secretadas a través de la membrana basal en los capilares que irrigan a los folículos. Este proceso de síntesis y secreción hormonal está controlado por la hormona hipofisaria TSH (Dumont, 1971), denominada hormona estimulante del tiroides o tirotrópi-

na, que transmite su señal al interior de la célula epitelial tiroidea a través de su receptor situado en la membrana basal (TSHR) (Fig. 1C).

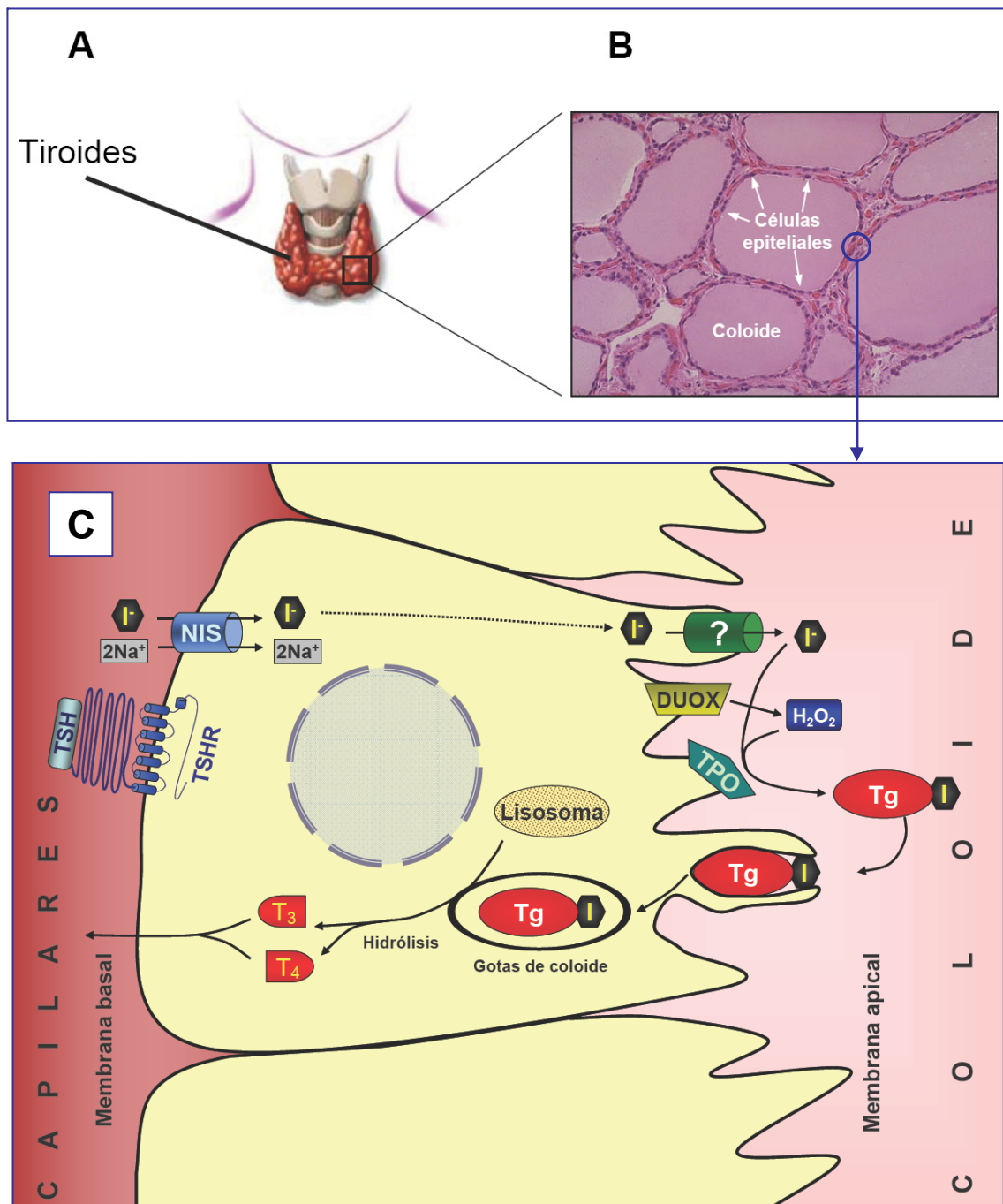


Fig. 1: A. Localización y morfología de la glándula tiroidea: La glándula tiroidea está formada por dos lóbulos unidos por un istmo, y se sitúa en la parte anterior de la tráquea. **B. Arquitectura de los folículos tiroideos:** Fotografía de un corte de tejido tiroideo teñido con hematoxilina y eosina, observado al microscopio óptico con un objetivo de 20 aumentos. **C. Metabolismo de la célula epitelial tiroidea:** Esquema del mecanismo de generación y secreción de hormonas tiroideas. NIS: Simportador de Na^+/I^- , DUOX: Oxidasa dual, TPO: Tiroperoxidasa, Tg: Tiroglobulina, T_3 : Triyodotironina, T_4 : Tiroxina, TSH: Tirotropina, TSHR: Receptor de tirotropina.

La expresión conjunta de *NIS*, *TPO*, *Tg* y *TSHR* es esencial para la función tiroidea y sólo tiene lugar en tejido tiroideo, por lo que son considerados genes marcadores de la diferenciación celular tiroidea. Sin embargo, estos genes “específicos” de tiroides codifican tanto para proteínas que se expresan exclusivamente en el tiroides, como la *Tg* y la *TPO*, como para proteínas que se expresan en otros tejidos, como *NIS* (Spitzweg, 1998) y el *TSHR* (Davies, 2002). La expresión de estos genes en el tiroides es posible gracias a la acción coordinada de una serie de factores de transcripción que incluyen a *TTF-1*, *FoxE1* y *Pax8*, clasificados respectivamente como miembros de las familias de factores de transcripción con dominios de unión al DNA de tipo homeodominio, “forkhead” y “paired-box”. Al igual que sucedía en el caso de los genes marcadores de la diferenciación tiroidea, estos factores de transcripción se expresan en otros tejidos (Lazzaro, 1991; Plachov, 1990; Zannini, 1997), aunque su expresión conjunta sólo se ha detectado en tejido tiroideo.

Entre los distintos marcadores de la diferenciación celular tiroidea, probablemente el más relevante para la fisiología y patología del tiroides sea *NIS*. La primera y fundamental etapa en el proceso de hormonogénesis tiroidea es la captación de I^- , que depende de la actividad de *NIS*. Gracias a su capacidad a la hora de captar I^- , este simportador ha sido utilizado extensamente como herramienta para el diagnóstico y la eliminación, mediante el uso de radioyodo, de tejido tiroideo hiperfuncionante así como de tumores tiroideos diferenciados que mantienen la expresión y funcionalidad de la proteína. De este modo numerosos estudios se centran en aumentar su expresión endógena y promover su correcta localización en membrana, donde la proteína es funcional, en tumores tiroideos no diferenciados, o alternativamente en expresar ectópicamente la proteína en tumores de tejidos que no expresan *NIS*, como tumores de próstata (Spitzweg, 1999), melanomas (Mandell, 1999), mielomas (Dingli, 2003) o gliomas (Cho, 2000) entre otros. Por lo tanto la caracterización de los procesos que controlan la expresión y actividad de *NIS*, así como de los factores de transcripción y vías de señalización implicados, es de gran importancia para el entendimiento de la fisiología tiroidea y de la terapia tumoral en general.

NIS es una glicoproteína situada en la membrana basolateral de la célula tiroidea, que importa I^- en contra de gradiente electroquímico acoplándolo al transporte de Na^+ a favor de gradiente electroquímico, con una estequiometría de $2Na^+$ por cada I^- . El modelo actual de la estructura secundaria de *NIS* corresponde a una glicoproteína compuesta por 13 dominios transmembrana con el dominio N-terminal situado en el exterior de la célula y el dominio C-terminal en el interior. La *TSH* ejerce un control riguroso sobre *NIS*, al que regula al menos a dos niveles: Por un lado induce su expresión a nivel transcripcional, y por otro aumenta su actividad a través de modificaciones postraduccionales. El promotor de *NIS* ha sido analizado en detalle (Fig. 2): Se ha descrito la presencia en su promotor proximal de un sitio de unión para *TTF-1* y un elemento de respuesta a *TSH* al que se

une un factor denominado NTF-1 (Factor de respuesta a TSH de NIS-1) (Ohmori, 1998). Sin embargo la regulación principal de la actividad del promotor, viene dada por una secuencia situada de -2495 a -2264 pb del sitio de inicio de la transcripción, que se ha denominado NUE (NIS upstream enhancer). Esta región contiene dos sitios de unión para Pax8 (PA y PB), y dos sitios de unión para TTF-1 (TA y TB), además de una secuencia degenerada de respuesta a cAMP (CRE-L), cuya integridad es esencial para la activación del promotor (Ohno, 1999).

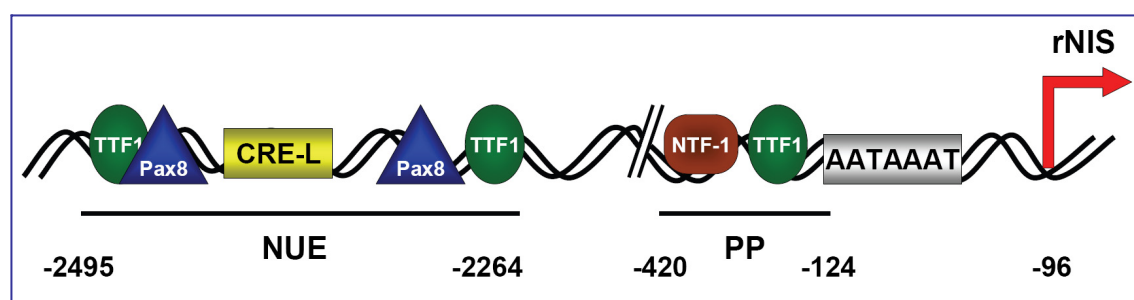


Fig. 2: Promotor de NIS. Representación esquemática del promotor de *NIS* de rata, incluyendo el promotor proximal (PP) y el NUE (NIS Upstream Enhancer). Los números indican la posición del sitio de inicio de la transcripción (-96), de la caja TATA (-124), del PP (-124 a -420) y de la región NUE (-2264 a -2495). Se indica de manera aproximada la localización de los sitios de unión al promotor de TTF-1, Pax8 y NTF-1, así como de la secuencia CRE-L (Similar al elemento de respuesta a cAMP).

Los factores de transcripción TTF-1 y Pax8 tienen una función destacada sobre el control de la diferenciación celular tiroidea. La familia de genes *Pax* codifica para proteínas implicadas en el desarrollo de diversos tejidos, que se unen al DNA mediante su dominio “paired-box”. Se ha demostrado que Pax8 es necesario tanto para la morfogénesis de la glándula tiroidea como para el mantenimiento del fenotipo celular tiroideo. El ratón *Pax8*(-/-) presentaba una glándula tiroidea apenas desarrollada y carente de estructuras foliculares (Mansouri, 1998), y diversas mutaciones en *Pax8* se han asociado con hipotiroidismo congénito en humanos (Macchia, 1998). Distintos trabajos han proporcionado evidencias de la importancia de Pax8 en el mantenimiento de la diferenciación tiroidea: Activa la expresión de todos los genes marcadores de la diferenciación tiroidea excepto del *TSHR* (Ohno, 1999; Zannini, 1992), además se ha descrito la interacción física y funcional entre Pax8 y TTF-1 *in vivo*, mediante la cual ambos factores aumentan sinérgicamente la transcripción de *Tg* (Di Palma, 2003). Ambos factores interaccionan además con el coactivador p300 (De Leo, 2000; Yi, 2002). En el caso de *NIS*, el factor de transcripción Pax8 parece tener un papel preponderante sobre el de TTF-1 (Ohno, 1999). Se ha descrito la pérdida de expresión de *Pax8* y *TTF-1* en carcinomas tiroideos no diferenciados (Fabbro, 1994), y la transformación de células de rata con PCPγ (Antígeno T mediano del virus del poliovirus) provocaba la pérdida de expresión de *Tg*, *TPO* y *NIS*, asociada con la pérdida de expresión de *Pax8*, en contraste con los niveles normales o moderadamente reducidos de TTF-1 y FoxE1 respectivamente. La reexpresión de *Pax8* permitía nuevamente

la expresión endógena de los marcadores de diferenciación tiroideos (Pasca di Magliano, 2000). Todos estos datos resaltan la importancia de los factores de transcripción mencionados en la especificación del fenotipo tiroideo, tanto durante el desarrollo tiroideo como en organismos adultos.

2. Receptores acoplados a proteínas G: El receptor de TSH

2.1. TSH

La TSH es el regulador principal de la glándula tiroidea. Tras la unión a su receptor estimula a las células epiteliales tiroideas en prácticamente todos los aspectos de su metabolismo, incluyendo la síntesis y secreción hormonal (Dumont, 1971). Distintos grupos han demostrado que la TSH regula los niveles de expresión de varios genes específicos de tiroides, como *Tg* (Santisteban, 1987), *TPO* (Damante, 1989) y *NIS* (Kogai, 1997). El *TSHR* sin embargo presenta una expresión constante, los niveles de mRNA apenas varían y su regulación es ejercida principalmente a nivel postraduccional (Vassart, 1992). La TSH también estimula la agregación de las células tiroideas para formar folículos (Lissitzky, 1971) y su presencia es necesaria para mantener la arquitectura folicular (Yap, 1995). Esta es una hormona glicoproteica con un tamaño de 28 a 30 kDa, sintetizada y secretada por las células tirotropas de la hipófisis. Pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas, que también incluye a la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona gonadotrófica coriónica (hCG). Estas hormonas se encuentran entre los ligandos endocrinos de mayor tamaño y complejidad, y presentan una estructura heterodimérica que consta de una subunidad α común a todas ellas, que se ha relacionado con la transmisión de la señal, y una subunidad β única para cada hormona, que les confiere especificidad biológica y está implicada en el reconocimiento del receptor (Lapthorn, 1994; Pierce, 1981) (Fig. 3). La actividad de estas hormonas depende en gran medida de su estado de glicosilación y a este respecto se ha descrito que la TSH desglicosilada artificialmente se comporta como un potente antagonista (Amr, 1985).

2.2. GPCRs

La TSH transmite su señal al interior de la célula tiroidea a través de su receptor situado en la membrana basal. El *TSHR* pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que es una enorme familia con más de 1000 miembros cuya característica común es la posesión de una estructura con 7 dominios transmembranales formados por hélices- α antiparalelas que son conectadas por lazos intra y extracelulares dispuestos alternativamente, con el extremo N-terminal localizado en el exterior de la célula y el C-terminal situado en el interior. Los receptores de esta

familia se agrupan principalmente en tres clases basándose en la similitud de su secuencia. Los miembros de cada clase presentan en torno a un 25% de identidad de secuencia en su región transmembrana y comparten una serie de residuos y motivos altamente conservados:

-La subfamilia A agrupa a la gran mayoría de GPCRs e incluye receptores de estímulos luminosos (rodopsina) y de adrenalina (receptores adrenérgicos) así como al subgrupo de receptores olfativos que constituyen la mayor parte de la familia.

-La subfamilia B está formada por unos 25 miembros, incluyendo los receptores de la familia de hormonas peptídicas gastrointestinales, el de hormona liberadora de corticotropina, el receptor de calcitonina y el de hormona paratiroidea.

-La subfamilia C es relativamente pequeña y entre sus miembros cuenta con la familia de receptores de glutamato, el receptor de GABA_B, el receptor de calcio y algunos receptores gustativos. Los miembros de esta subfamilia presentan un gran dominio N-terminal extracelular que es fundamental para la unión de su ligando y para su activación.

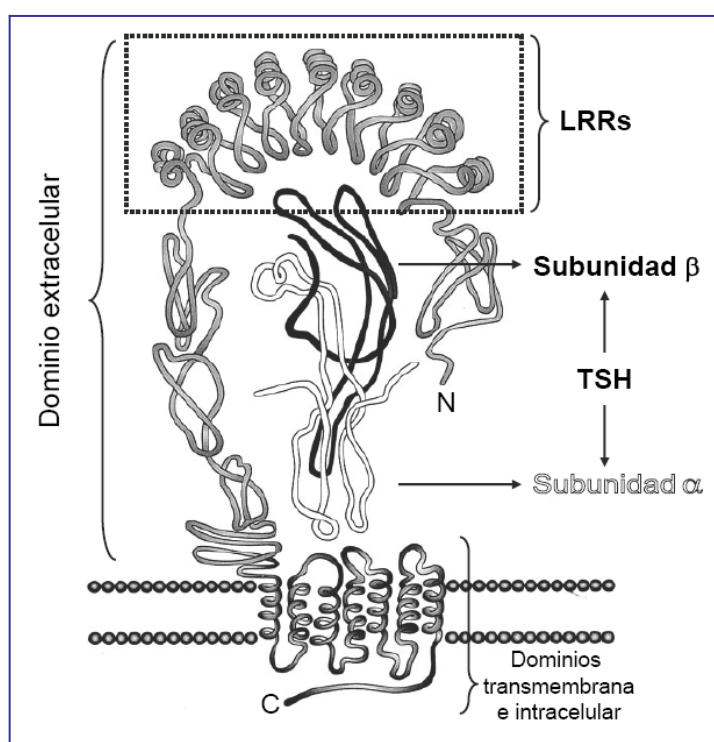


Fig. 3: Estructura terciaria del complejo TSH-TSHR. Se muestra la configuración del receptor de TSH (en gris) con el dominio transmembrana y el gran dominio extracelular en cuyo interior se sitúa la TSH, incluyendo la subunidad α (en blanco) que contacta con los lazos extracelulares del dominio transmembrana del receptor y la subunidad β (en negro) que se asocia con la zona de repeticiones ricas en Leu (LRR) del dominio extracelular del receptor.

2.3. TSHR

El TSHR pertenece a la subfamilia A de GPCRs y está relacionado con el grupo de receptores de hormonas glicoproteicas. Está formado por 2 subunidades codificadas por un solo gen que contiene 10 exones: La subunidad α , compuesta por un gran dominio extracelular es codificada por los

exones 1 a 9 y parte del último exón y la subunidad β , formada por un dominio transmembrana e intracelular es codificada en su totalidad por el último exón (Gross, 1991). La presencia de este gran dominio extracelular es característica de los receptores de hormonas glicoproteicas y su longitud es de unos 400 aminoácidos, representando aproximadamente la mitad del peso molecular de la proteína. En la estructura del dominio extracelular, se observa la presencia de un péptido señal en su extremo N-terminal, y una porción central que contiene 9 motivos de repeticiones ricas en Leu (LRR), flanqueadas por dominios ricos en Cys que se han relacionado con la formación de su estructura terciaria. Los motivos LRRs están formados por unos 25 residuos de Leu que forman una lámina β y una α -hélice conectadas por un lazo, generando en su conjunto una estructura en forma de herradura con las láminas β en la superficie cóncava, que constituye el sitio de unión de la TSH. La subunidad β está formada por 7 dominios transmembranales unidos alternativamente por lazos extra e intracelulares y un pequeño dominio C-terminal citoplasmático (Szkudlinski, 2002) (Fig. 3).

El dominio extracelular es suficiente para la unión de la hormona con alta afinidad para lo que no es necesaria la presencia de la estructura transmembrana (Szkudlinski, 2002). También se ha demostrado su importancia en el mantenimiento de la conformación inactiva del receptor, ya que su degradación proteolítica o eliminaciones de diverso tamaño en esta región, provocan la activación del receptor en ausencia de ligando (Zhang, 1995).

3. Proteínas G heterotriméricas

Los sistemas de señalización transmembrana comparten dos elementos básicos: Un receptor que es capaz de reconocer estímulos extracelulares y un efector que es controlado por el receptor y que puede generar una señal intracelular. Algunos sistemas de señalización transmembrana como los receptores con actividad tirosina kinasa incorporan estos dos elementos en una sola molécula; en contraposición, el sistema de señalización mediado por proteínas G (proteínas de unión a nucleótidos de guanina) es relativamente complejo y consta de un receptor, un complejo heterotrimérico de proteínas G y un efector. Este diseño modular permite la convergencia y divergencia de las señales en los puntos de contacto entre receptor y proteína G, así como entre proteína G y efector. Además, cada componente puede ser regulado independientemente por proteínas adicionales, mediadores solubles o a nivel transcripcional. La complejidad de la organización de los sistemas de señalización a través de membrana mediados por proteínas G, proporciona las bases para la activación de una enorme variedad de rutas de señalización, que confieren funciones particulares en distintos tipos celulares.

Las proteínas G heterotriméricas son las responsables de transmitir la señal desde el receptor hasta el efector. Están formadas por tres subunidades: α , β y γ . Hasta la fecha se han identificado genes que codifican para 16 subunidades α , 5 β y 12 γ (Downes, 1999). Las subunidades $G\alpha$ están compuestas por un dominio GTPasa implicado en la unión e hidrólisis de GTP (Kjeldgaard, 1996) y un dominio α -hélice en cuyo núcleo se encierra el nucleótido de guanina (Coleman, 1994). El dominio α -hélice es el dominio más divergente entre las proteínas $G\alpha$ y desempeña un papel importante controlando la especificidad de unión de las proteínas G al receptor (Bourne, 1997). La subunidad β de las proteínas G heterotriméricas presenta una estructura “ β -propeller” que contiene 7 repeticiones WD-40 (Lambright, 1996). La subunidad $G\gamma$ interacciona con la subunidad $G\beta$ a través de un dominio N-terminal de tipo “coiled-coil”, que forma numerosos contactos a lo largo de la base de la subunidad β (Lambright, 1996) (Fig. 4), formando un complejo heterodimérico que sólo se separa en condiciones desnaturalizantes (Hamm, 1998), exceptuando a la subunidad β_5 que forma un complejo comparativamente débil con las subunidades γ (Wettschureck, 2005).

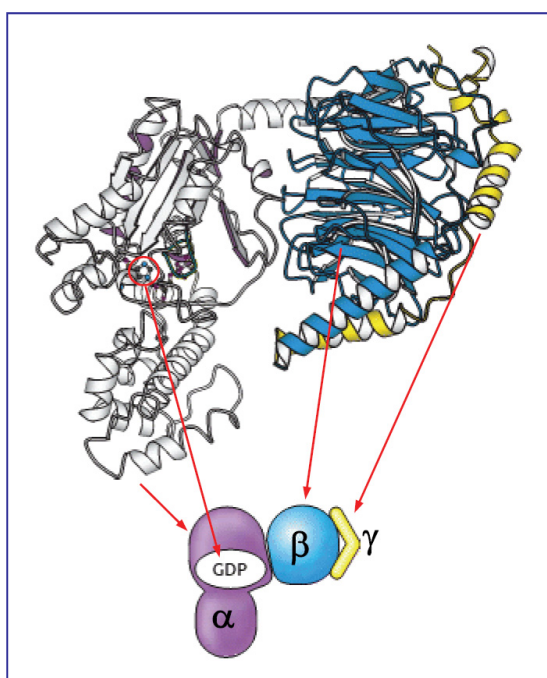


Fig. 4: Representación de la estructura terciaria del complejo heterotrimérico de proteínas G. Subunidad α (en blanco) unida al dímero $\beta\gamma$ (azul y amarillo respectivamente). El dominio N-terminal de la subunidad α interactúa con el dominio C-terminal de la subunidad β . La subunidad β se une a la subunidad γ formando múltiples uniones a lo largo de los dominios N-terminales de ambas proteínas. El nucleótido de guanina se sitúa en el interior de la subunidad $G\alpha$.

3.1. Familias de proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas se agrupan en cuatro familias en base a la similitud de secuencia de las subunidades α que forman parte del heterotr trímero: $G\alpha_s$, $G\alpha_i/G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ y $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$. Los miembros de cada familia son estructuralmente similares y con frecuencia comparten algunas de sus propiedades funcionales. La mayoría de receptores, como es el caso del TSHR, son capaces de activar a más de un subtipo de proteínas G, dando lugar a la activación de varias rutas

de transducción de señales mediadas tanto por subunidades α como por complejos $\beta\gamma$. Por el contrario, algunos receptores interactúan sólo con ciertas formas de proteínas G. El patrón de proteínas G activadas por un receptor dado determina su respuesta celular y distintos receptores cuya activación da lugar a efectos funcionalmente similares en una célula, normalmente activan a los mismos subtipos de proteínas G. En la Fig. 5 se observa una relación de los efectores activados por las distintas isoformas de proteínas $G\alpha$.

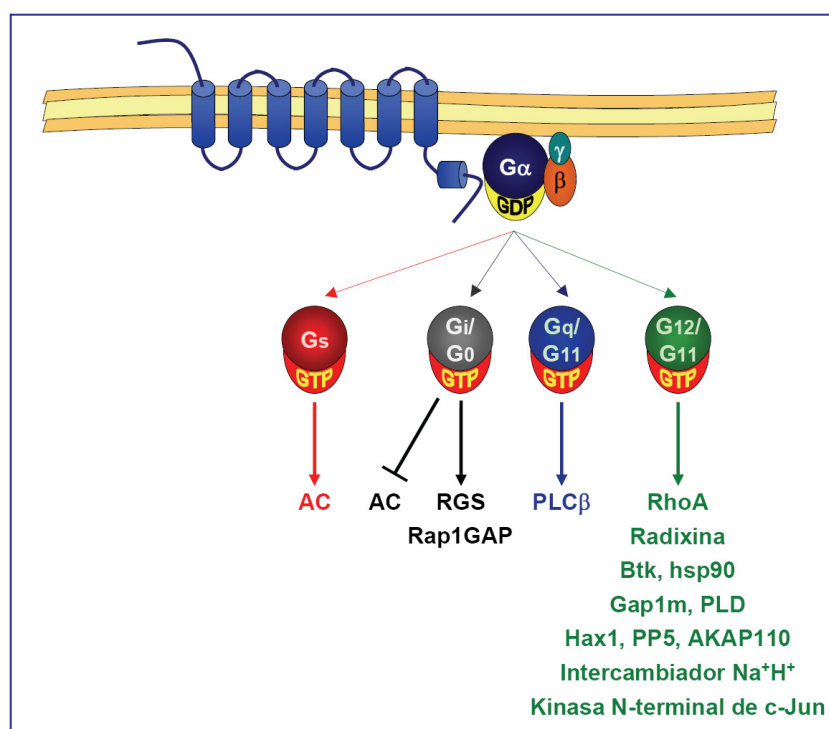


Fig. 5: Efectores de las distintas isoformas de las subunidades $G\alpha$. Una vez activadas las proteínas $G\alpha$ pueden actuar sobre distintos efectores. Las flechas representan la activación y las líneas truncadas representan la inhibición de los efectores indicados. AC: Adenilato ciclasa, RGS: Reguladores de la señalización de proteínas G, PLC β : Fosfolipasa C β , Btk: Tirosina kinasa de Bruton, hsp90: Proteína de choque térmico, 90kDa, PLD: Fosfolipasa D, PP5: Proteína fosfatasa-5, AKAP110: Proteína de anclaje de PKA 110kDa.

3.1.1. Gs

La proteína de expresión ubicua Gs acopla a numerosos receptores con la activación de la AC (Adenilato ciclasa), promoviendo aumentos en la concentración intracelular del segundo mensajero cAMP. La subunidad α de Gs, es codificada por *GNAS*, un gen muy complejo que da lugar a la expresión de distintos productos génicos debido a la presencia de varios promotores y de mecanismos de procesamiento alternativo. La acción de la subunidad $G\alpha_s$ ha sido analizada con frecuencia mediante el uso de la toxina colérica (CTX) de la bacteria *Vibrio cholerae*, que tiene la capacidad de ribosilar nucleótidos de ADP de la subunidad $G\alpha_s$ en residuos específicos, lo que provoca la disminución de su actividad GTPasa intrínseca y su activación constitutiva (Glineur, 1994).

3.1.2. Gi/Go

Las proteínas G de la familia Gi/Go presentan un amplio patrón de expresión y se ha demostrado, especialmente para las subunidades $G\alpha i1$, $G\alpha i2$ y $G\alpha i3$, que median la inhibición de las isoformas I, IV y VI de AC (Sunahara, 1996). La similitud estructural entre los 3 subtipos de proteínas $G\alpha i$ sugiere que pueden tener funciones parcialmente solapadas. La activación de Gi/Go es el principal mecanismo que conduce a la activación de procesos de señalización mediados por complejos $G\beta\gamma$. Al contrario que otras proteínas G, los efectos de Go, que es particularmente abundante en el sistema nervioso, parecen estar mediados principalmente por su complejo $G\beta\gamma$, y aún no está claro si la subunidad $G\alpha o$ puede regular efectores directamente. La función de miembros de la familia Gi/Go se ha estudiado utilizando la toxina pertúxica (PTX) de la bacteria *Clostridium botulinum*, que es capaz de ribosilar nucleótidos de ADP de la mayoría de miembros de la familia $G\alpha i/G\alpha o$, impidiendo su unión al receptor y por tanto su activación (Locht, 1995). $G\alpha z$ es el miembro de la familia $G\alpha i/G\alpha o$ con una expresión más reducida (Gagnon, 1991) y al contrario que Gi y Go no se ve afectado por el tratamiento con PTX (Fong, 1988). $G\alpha z$ interacciona específicamente con proteínas como Rap1GAP y ciertas proteínas RGS (Reguladores de la señalización de proteínas G) (Meng, 1999).

3.1.3. Gq/G11

Esta familia de proteínas tiene como efectores a isoformas de la fosfolipasa $C\beta$ (PLC β) (Rhee, 2001). Los receptores que se acoplan a la familia Gq/G11 no parecen discriminar entre ambos subtipos de proteínas G (Wu, 1992; Xu, 1998) y consecuentemente no hay una diferencia significativa entre la capacidad de ambas subunidades α de regular a las isoformas de la PLC β . El significado biológico de la diversidad de miembros de esta familia, con un patrón de expresión y funciones similares, aún no ha sido esclarecido.

3.1.4. G12/G13

Las proteínas G12 y G13, que con frecuencia son activadas por receptores que también se acoplan a Gq/G11, constituyen la familia de expresión ubicua G12/G13 (Dhanasekaran, 1996). Se ha demostrado que estas proteínas pueden estimular rutas de señalización que llevan a la activación de la PLD, el intercambiador de Na^+/H^+ o la quinasa NH2-terminal de c-Jun (Dhanasekaran, 1996; Hooley, 1996; Plonk, 1998). Otra importante función celular de los miembros de la subfamilia G12/G13 es su capacidad de regular la formación de estructuras de actomiosina, modulando su

contractibilidad mediante el aumento de la actividad de la GTPasa RhoA (Buhl, 1995), que está mediada por un subgrupo de factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) de Rho (Fukuhara, 2001; Kozasa, 1998; Suzuki, 2003). Además se ha demostrado la interacción de $G\alpha_{12}$ y/o $G\alpha_{13}$ con otras proteínas como Btk y Gap1m (Jiang, 1998), radixina (Vaiskunaite, 2000), hsp90 (Waheed, 2002), AKAP110 (Niu, 2001), la fosfatasa PP5 (Yamaguchi, 2002) o Hax-1 (Radhika, 2004).

3.2. El complejo $G\beta\gamma$

El complejo $G\beta\gamma$ fue inicialmente descrito como un compañero pasivo de la subunidad $G\alpha$, con funciones estabilizadoras cuando el complejo heterotrimérico se encuentra en un estado inactivo y facilitando la liberación del nucleótido de GDP en respuesta a un receptor activado. Sin embargo se ha demostrado que los complejos $G\beta\gamma$ también pueden activar a un gran número de efectores y se ha descrito que pueden activar a canales iónicos (Schneider, 1997), a la $PLC\beta$ (Rhee, 1997), también interaccionan con quinasas de GPCRs facilitando su localización en la membrana en las cercanías de su receptor diana (Pitcher, 1992), pueden activar a las isoformas β (Murga, 2000) y γ (Kerchner, 2004) de la PI3K y a la vía de las MAPKs (Crespo, 1994; Faure, 1994), así como activar o inhibir a distintas isoformas de la AC (Sunahara, 1996) (Fig. 6).

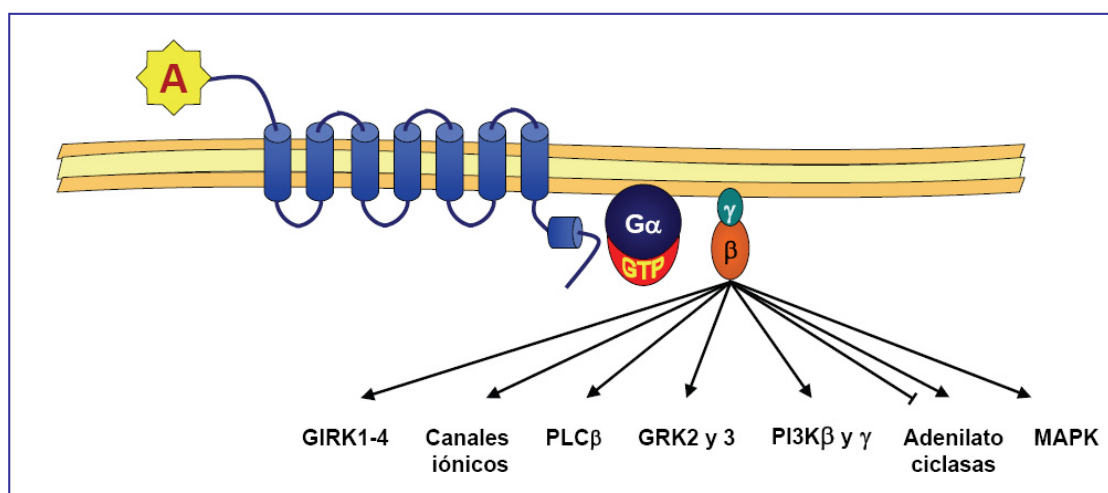


Fig. 6: Efectores de los dímeros $G\beta\gamma$. En presencia de un agonista (A), el receptor es activado y se produce la disociación del complejo de proteínas G heterotriméricas permitiendo la actuación de los dímeros $G\beta\gamma$ sobre sus efectores. Las flechas indican activación y las líneas troncadas inhibición de los efectores indicados. GIRK: Canales de K^+ rectificadores internos acoplados a proteínas G, $PLC\beta$: Fosfolipasa C β , GRK: Kinasa regulada por proteínas G, PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinasa, MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

Hasta el momento se han identificado 5 subunidades $G\gamma$ y 12 $G\beta$ diferentes (Downes, 1999), la mayoría de subunidades $G\beta$ pueden dimerizar *in vitro* con la mayoría de subunidades $G\gamma$, con excepciones como $G\beta 2$ que dimeriza *in vitro* con $G\gamma 2$, pero no con $G\gamma 1$, o de $G\beta 3$ que no dimeriza con $G\gamma 1$ ó $G\gamma 2$ (Garritsen, 1994; Schmidt, 1992; Spring, 1994). Aunque *in vivo* también se pueden formar dímeros $G\beta\gamma$ de composición variable, ésta dependerá de la expresión específica de tejido de las distintas subunidades $G\beta$ y $G\gamma$. Por ejemplo, en la retina el complejo $G\beta\gamma$ más abundante está formado por la combinación de $G\beta 1$ y $G\gamma 1$, mientras que el dímero constituido por $G\beta 1$ y $G\gamma 2$ es el más común en cerebro (Tamir, 1991).

Debido a la baja selectividad que demostraban estas proteínas en cuanto a su capacidad de dimerización *in vitro*, inicialmente se pensó que los dímeros $G\beta\gamma$ eran en su mayor parte intercambiables. Los estudios actuales indican que la composición del dímero $G\beta\gamma$ determina la calidad y eficiencia de activación del efector y puede mediar la especificidad de unión entre receptor y proteínas G del mismo modo que las subunidades $G\alpha$. De este modo, la naturaleza de las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ que forman parte del complejo heterodimérico pueden afectar al grado y capacidad de activación de su efector (Ueda, 1994), y determinar si el efecto sobre su sustrato es estimulador o inhibidor (Bayewitch, 1998b). En este sentido parece que la subunidad $G\beta$ tiene más importancia a la hora de determinar la eficiencia y especificidad de unión al efector.

Con respecto a la especificidad de unión del receptor a la proteína G, tanto $G\beta 1\gamma 2$ como $G\beta 5\gamma 2$ pueden unir proteínas $G\alpha_q$ al receptor de endotelina B y a receptores muscarínicos de tipo M1. Sin embargo, $G\beta 1\gamma 2$ pero no $G\beta 5\gamma 2$ promueve la interacción entre el receptor de endotelina B y la proteína $G\alpha_i$ (Lindorfer, 1998). Con la excepción de $G\beta 5$, el tipo de subunidad $G\beta$ no parece ser crítico para determinar la especificidad de unión entre proteína G y receptor. Por ejemplo, los receptores de adenosina A1 se unen igualmente a proteínas G_i que contienen dímeros $G\beta 1\gamma 2$, $G\beta 1\gamma 3$, $G\beta 2\gamma 2$ o $G\beta 2\gamma 3$ (Figler, 1996). También se ha descrito que las modificaciones lipídicas del dímero $G\beta\gamma$ afectan a la eficiencia de acoplamiento entre receptor y proteínas G, ya que proteínas G que contienen una subunidad $G\gamma$ farnesilada se unen con menor eficiencia al receptor A1 (Yasuda, 1996).

3.3. Proteínas G que se acoplan al TSHR

La mayoría de efectos transmitidos por el TSHR sobre la célula tiroidea, tales como la organización del yoduro, la producción y secreción de hormonas tiroideas y la proliferación de la célula tiroidea se han asociado con la activación de la vía $G_s/cAMP$ (Vassart, 1992). En este sentido se ha

descrito que en ratones deficientes para el receptor de TSH, la estimulación directa de la AC recupera la capacidad de concentrar y organificar el yoduro (Marians, 2002). Además la expresión de una subunidad $G\alpha_s$ constitutivamente activa en la línea celular tiroidea de rata FRTL-5, promueve tanto su crecimiento como su diferenciación de manera independiente de TSH (Muca, 1994). Sin embargo y dependiendo de la especie estudiada se ha observado que el TSHR es capaz de asociarse a distintos tipos de proteínas G. Mediante la inmunoprecipitación de proteínas $G\alpha$ de membranas aisladas de células tiroideas humanas, se ha demostrado que el TSHR humano es capaz de asociarse a miembros de las cuatro familias de proteínas G (Laugwitz, 1996). En un ensayo similar realizado con membranas de células tiroideas de perro, se observó que el TSHR era capaz de unirse a proteínas G de las familias G_s , G_i/Go y G_q/G_{11} , aunque como se deduce de la medida de la actividad de sus respectivos efectores, en células intactas sólo las dos primeras se asociaban funcionalmente con el TSHR (Allgeier, 1997). En la línea celular tiroidea de rata FRTL-5, la TSH utilizada a concentraciones fisiológicas, activa únicamente la cascada del cAMP (Dumont, 1971). Diversos estudios realizados tanto en células FRTL-5 como en tirocitos de perro, han descrito la activación de la vía mediada por $G\alpha_q$ en respuesta a TSH, sin embargo los efectos observados son muy débiles y las concentraciones de hormona necesarias para observar esta estimulación, son de 100 a 1000 veces superiores a las necesarias para activar la vía de $G_s/cAMP$ (Field, 1987). En tiroides humanos sucede algo parecido, aunque la cantidad de TSH necesaria para activar, también débilmente, la vía de la PLC es de 5 a 10 veces mayor que la requerida para activar la vía $G_s/cAMP$ (Laurent, 1987). Con respecto a los dímeros $G\beta\gamma$ liberados por la acción de la TSH y a sus posibles funciones en la señalización de las células epiteliales tiroideas, es un tema que aún está por descubrir y que es motivo de estudio en este trabajo de tesis doctoral.

3.4. Mecanismo de transmisión de la señal a través de GPCRs

El complejo heterotrimérico de proteínas G sufre un ciclo de activación-inactivación para transmitir la señal del estímulo desde el receptor activado hasta su efector (Fig. 7). En su estado basal la subunidad $G\alpha$ se encuentra unida a un nucleótido de GDP y en esta conformación presenta una región hidrofóbica a la que se une el complejo $G\beta\gamma$. El complejo inactivo GDP- $G\alpha$ - $G\beta\gamma$ se encuentra asociado a la superficie interna de la membrana plasmática, en las proximidades del receptor, mediante modificaciones lipídicas presentes en la subunidad $G\alpha$ y $G\gamma$. Estas modificaciones lipídicas incluyen procesos de miristilación en el caso de algunas isoformas de la subunidad $G\alpha$ (Wedegaertner, 1998); palmitilación, que se da en todas las subunidades $G\alpha$ exceptuando a la subunidad $G\alpha_T$ (Wedegaertner, 1998); e isoprenilación en el extremo C-terminal de la subunidad $G\gamma$,

que aunque no es necesaria para la formación del complejo $G\beta\gamma$, es fundamental para el anclaje del dímero a la membrana y para su interacción tanto con el receptor como con sus efectores y con la subunidad $G\alpha$ (Cabrera-Vera, 2003). La unión del ligando al dominio extracelular del receptor, genera un cambio conformacional en la región transmembrana, que permite su asociación con el complejo heterotrimérico de proteínas G y promueve la liberación del nucleótido de GDP asociado a la subunidad $G\alpha$ y la entrada de un nucleótido de GTP. La unión de GTP a la subunidad $G\alpha$ provoca la pérdida de la región hidrofóbica a la que se une el dímero $G\beta\gamma$, permitiendo la separación del heterotrímico, que se disocia y libera a la subunidad $G\alpha$ activada y al dímero $G\beta\gamma$, que ahora son capaces de interactuar con sus efectores. La transmisión de la señal finaliza cuando el nucleótido de GTP es hidrolizado merced a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$. La subunidad $G\alpha$ unida a GDP resultante, se reasocia con un complejo $G\beta\gamma$ para comenzar un nuevo ciclo de activación si hay receptores activados presentes.

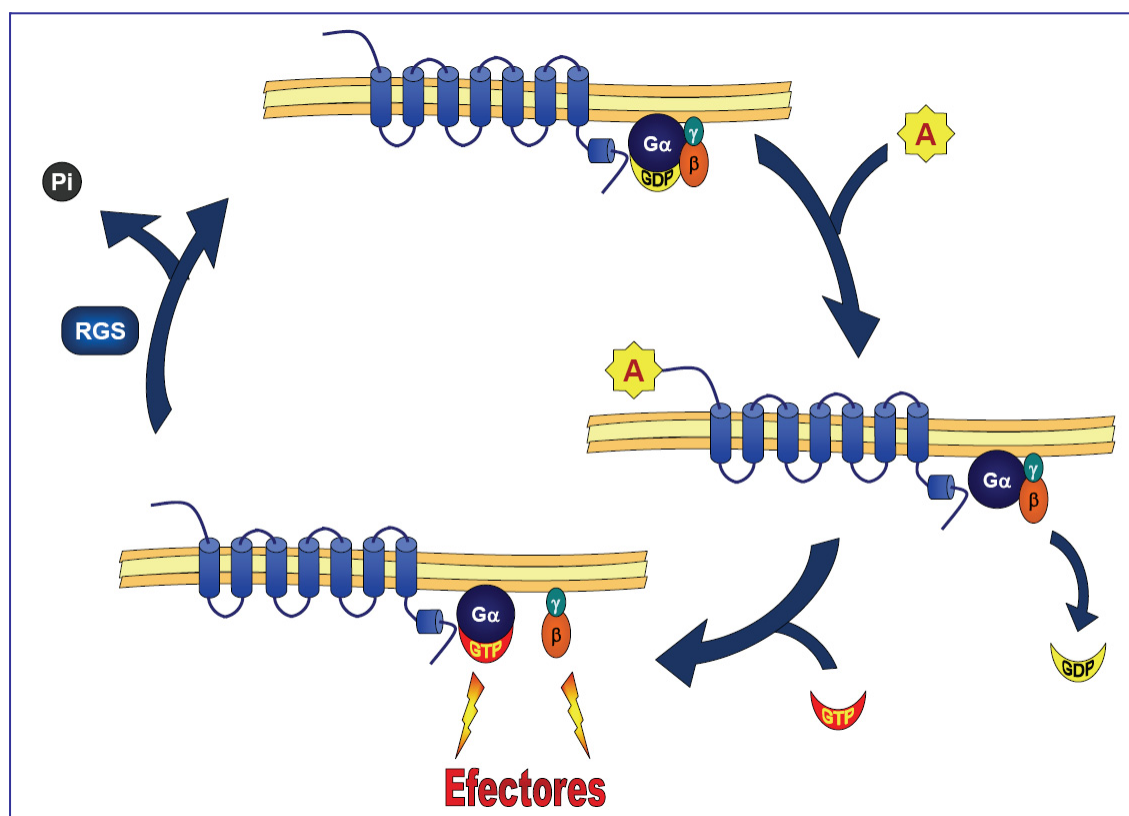


Fig. 7: Mecanismo de transmisión de la señal a través de GPCRs. La interacción de un agonista (A) con su receptor de membrana facilita el acoplamiento del receptor activado con el complejo heterotrimérico de proteínas G, promoviendo el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$. La subunidad $G\alpha$ unida a GTP se disocia del dímero $G\beta\gamma$ y del receptor. Ambas subunidades son libres de modular la actividad de sus efectores. La finalización de la señal se produce cuando el fosfato γ (Pi) del GTP es liberado debido a la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$, dejando un nucleótido de GDP unido a la subunidad $G\alpha$. Este complejo se reasocia con un dímero $G\beta\gamma$ finalizando el ciclo. Las proteínas RGS aceleran la actividad GTPasa de las subunidades $G\alpha$, reduciendo la duración de los eventos de señalización desencadenados tras la activación del receptor.

Mientras que la cinética de activación de proteínas G a través de GPCRs ha sido ampliamente estudiada y bien caracterizada, la regulación del proceso de desactivación está comenzando a entenderse recientemente. Basándose en la observación de que la actividad GTPasa de proteínas $G\alpha$ aisladas es mucho menor que la observada en condiciones fisiológicas, se ha propuesto la existencia de mecanismos que aumentan esta actividad GTPasa. En este sentido, se han encontrado varios efectores que aumentan la actividad GTPasa de las subunidades $G\alpha$, contribuyendo por tanto a su desactivación y permitiendo un rápido control de la señalización mediada por proteínas G (Berstein, 1992; Kozasa, 1998; Scholich, 1999). Con respecto a esta función, se ha identificado una familia de proteínas llamadas RGS que son capaces de aumentar la actividad GTPasa de las subunidades $G\alpha$ (Ross, 2000). Actualmente se conocen unos 30 miembros de esta familia de proteínas que actúan selectivamente sobre las distintas subfamilias de proteínas $G\alpha$.

4. Vías de señalización activadas por TSH

4.1. Activación a través de $G\alpha_s$

La mayoría de los efectos de la TSH sobre la célula epitelial tiroidea son transmitidos a través de la subunidad $G\alpha_s$ del complejo de proteínas G heterotriméricas (Fig. 8). La activación del TSHR por la TSH, promueve la liberación de la subunidad $G\alpha_s$ activada, que en este estado es capaz de reconocer y activar a su efector, la enzima AC.

4.1.1. Adenilato ciclasa

En mamíferos se han identificado 9 genes que codifican para isoformas de AC que se unen a membrana y un gen que codifica para una AC soluble (sAC). Estas se dividen en 5 familias en cuanto a su secuencia de aminoácidos y a sus propiedades funcionales. Podemos encontrar AC sensibles a Ca^{2+} -Calmodulina (isoformas I, III y VIII), estimuladas por dímeros $G\beta\gamma$ (II, IV y VII), inhibidas por Ca^{2+} y $G\alpha_i$ (V y VI), una isoforma insensible al diterpeno forskolina (IX) que constituye el único miembro de esta familia, y finalmente la familia formada por la sAC, que es la única que no se encuentra asociada a membrana. Todas las isoformas son activadas por la subunidad $G\alpha_s$ y por el diterpeno forskolina, exceptuando a la sAC, insensible a ambos estímulos, y a la ACIX, insensible a forskolina (Sunahara, 1996). En tirocitos de perro y de humano se ha detectado la expresión elevada de las isoformas III, VI y IX (Vanvooren, 2000). La AC activada cataliza la hidrólisis de ADP para generar cAMP.

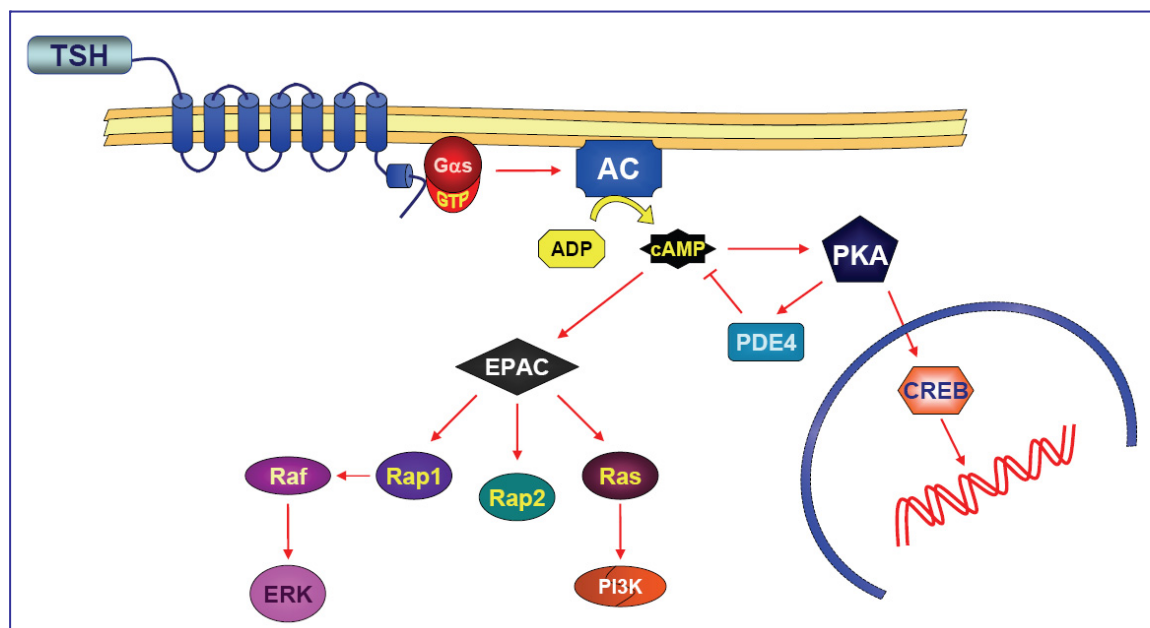


Fig. 8: Vías de señalización activadas por TSH. Tras la activación del receptor de TSH se activa mayoritariamente la vía de la subunidad $G\alpha_s$, activando a la enzima adenilato ciclasa (AC) que promueve la generación del segundo mensajero cAMP a partir de ADP. El cAMP puede activar diversas vías de señalización, actuando sobre la PKA (Proteína quinasa dependiente de cAMP) que transmite su señal a través del factor de transcripción CREB (Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP), PDE4 (fosfodiesterasa 4) que permite la finalización de la señal del cAMP o Epacs (factores de intercambio de GTP activados por cAMP). Estos últimos pueden activar importantes vías de señalización como la de Ras/PI3K o Rap1/Raf/ERK. Las flechas indican activación y las líneas troncadas inhibición.

4.1.2. cAMP y PKA

El cAMP es un segundo mensajero que puede activar distintas rutas de señalización en la célula, siendo la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) su principal efector y al que se han asociado la mayoría de efectos fisiológicos del cAMP. Esta es una enzima formada por 2 subunidades catalíticas y 2 subunidades reguladoras que se unen a cAMP. Hasta la fecha se han encontrado 3 subunidades catalíticas y 4 reguladoras diferentes y dependiendo de la combinación, la PKA correspondiente formará parte de sustratos citosólicos (PKA I) o de la membrana de ciertas organelas (PKA II). La activación de PKA se produce cuando el cAMP se une a las subunidades reguladoras, que entonces liberan a las subunidades catalíticas permitiendo su localización nuclear y la activación subsecuente de mecanismos transcripcionales dependientes de PKA (Skalhegg, 2000).

4.1.3. Otros efectores del cAMP

La PKA es considerada la mediadora principal de los eventos de señalización intracelulares que se desencadenan tras el aumento de los niveles de cAMP. Sin embargo, diferentes observaciones han indicado que PKA no es la única diana intracelular del cAMP. La activación de PKA en células ti-

roideas es necesaria (Kimura, 2001), pero no suficiente (Dremier, 1997) para reproducir los efectos del cAMP. En este sentido se han descrito nuevas dianas que se activan en respuesta a cAMP (Fig. 8), como los factores de intercambio de GTP activados por cAMP (cAMP-GEF o Epac) (Dremier, 2000), que funcionan acelerando el intercambio de GDP por GTP y activan a GTPasas como Rap1 (Hochbaum, 2008), Rap2 (de Rooij, 2000) y Ras (Pham, 2000). GTP-Rap1 puede activar a las kinasas Raf-1 y B-Raf, que a su vez activan la cascada de ERK (Iacovelli, 2001). La activación de Ras es de particular importancia, ya que puede activar importantes rutas de señalización como la de la PI3K (Cass, 2000), y se ha demostrado que la activación de Ras es necesaria para la mitogénesis de las células tiroideas inducida por TSH (al-Alawi, 1995). La TSH también activa a algunas fosfodiesterasas como PDE4, que proporcionan un mecanismo de regulación negativa para la finalización de la señal del cAMP (MacKenzie, 2002). Dada la enorme variedad de efectores del cAMP, esta compleja ruta de señalización necesitará de numerosos estudios para ser entendida en detalle.

4.1.4. CREB

Una vez activada, la PKA promueve la fosforilación de distintas dianas, como el factor de transcripción de expresión ubicua CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP), que promueve la expresión de genes implicados en la diferenciación y proliferación celular tiroidea. Este es uno de los sustratos mejor caracterizados de la PKA, que fosforila a CREB en el residuo de Ser133 y lo activa para estimular la transcripción de multitud de genes de respuesta a cAMP, mediante su unión a las secuencias CRE presentes en sus promotores (Alberts, 1994). Se ha demostrado que la actividad de CREB es importante en la ruta de TSH/cAMP/PKA que promueve la proliferación y diferenciación del tirocito (Nguyen, 2000; Woloshin, 1992), sin embargo la activación de CREB no es suficiente para reproducir completamente la síntesis de DNA dependiente de TSH (Dremier, 1997).

4.2. Señalización cruzada

A pesar del papel central del cAMP en la regulación de los procesos biológicos de las células tiroideas, la cooperación con otras rutas de señalización es necesaria (Kimura, 2001; Medina, 2000a) para que los tirocitos desarrollen una actividad mitogénica completa en respuesta a TSH. En este sentido, la PI3K tiene una función destacada en el control de la proliferación y de la diferenciación tiroidea. El tratamiento con inhibidores de la PI3K o la expresión de un mutante dominante negativo de la proteína, provoca la parada en G1 de células tiroideas de rata estimuladas con TSH (Cass, 1999; Medina, 2000b). Esta vía de señalización es activada en células tiroideas por varios fac-

tores de crecimiento tales como la insulina/IGF-1 (Factor de crecimiento similar a insulina-1), el HGF (Factor de crecimiento de hepatocitos) o el EGF (Factor de crecimiento epidérmico) (Kimura, 2001). El más importante de estos factores en el control del metabolismo tiroideo es el IGF-1.

5. Insulina/IGF-1 y PI3K

Los efectos biológicos de la insulina y del IGF-1 son mediados por la activación de sus receptores de membrana con actividad tirosina kinasa, que presentan una expresión constitutiva en células tiroideas de rata (Tramontano, 1988; Trischitta, 1987). La unión de sus respectivos ligandos induce su dimerización y autofosforilación en residuos específicos de Tyr, seguida de la fosforilación de residuos de Ser presentes en el dominio C-terminal. Esta serie de fosforilaciones permite la unión de moléculas adaptadoras como IRS-1, Shc o las proteínas 14-3-3 (Baserga, 1997; Pollak, 2004), que comunican al receptor con diversas rutas de señalización implicadas en procesos como el crecimiento, la transformación, la diferenciación o la supervivencia. Shc transmite su señal mediante la ruta de Grb2/Ras/Raf/MAPK. Sin embargo la mayoría de efectos de la insulina/IGF-1 son mediados por la kinasa lipídica PI3K (Fosfatidilinositol 3'-kinasa), que es atraída a las inmediaciones de la membrana plasmática tras la fosforilación del IRS-1 (Sustrato del receptor de insulina-1) por el receptor activado (Fig. 9).

5.1. PI3K

La superfamilia de las PI3Ks está compuesta por una serie de enzimas relacionadas estructuralmente, con diferente especificidad por sus sustratos y diferentes mecanismos de regulación, y que desempeñan funciones muy diversas dentro de la célula (Fry, 2001; Katso, 2001; Rameh, 1999). Se han descrito 8 isoformas de esta familia, que se han dividido en tres grupos en base a la estructura de sus dominios, su especificidad a la hora de reconocer sustratos lipídicos y las subunidades reguladoras a las que se asocian.

5.1.1. Clases de PI3Ks

La clase I está compuesta por la subclase IA, que comprende a las isoformas p110 α , p110 β y p110 δ , y la subclase IB, compuesta por la isoforma p110 γ . Su sustrato principal *in vivo* es el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2). Las tres isoformas catalíticas de esta subclase, están codificadas por tres genes independientes y se han descrito siete proteínas adaptadoras generadas por la expresión y procesamiento alternativo de estos genes: p85 α , p85 β y p55 γ . Las isoformas p110 α y β están am-

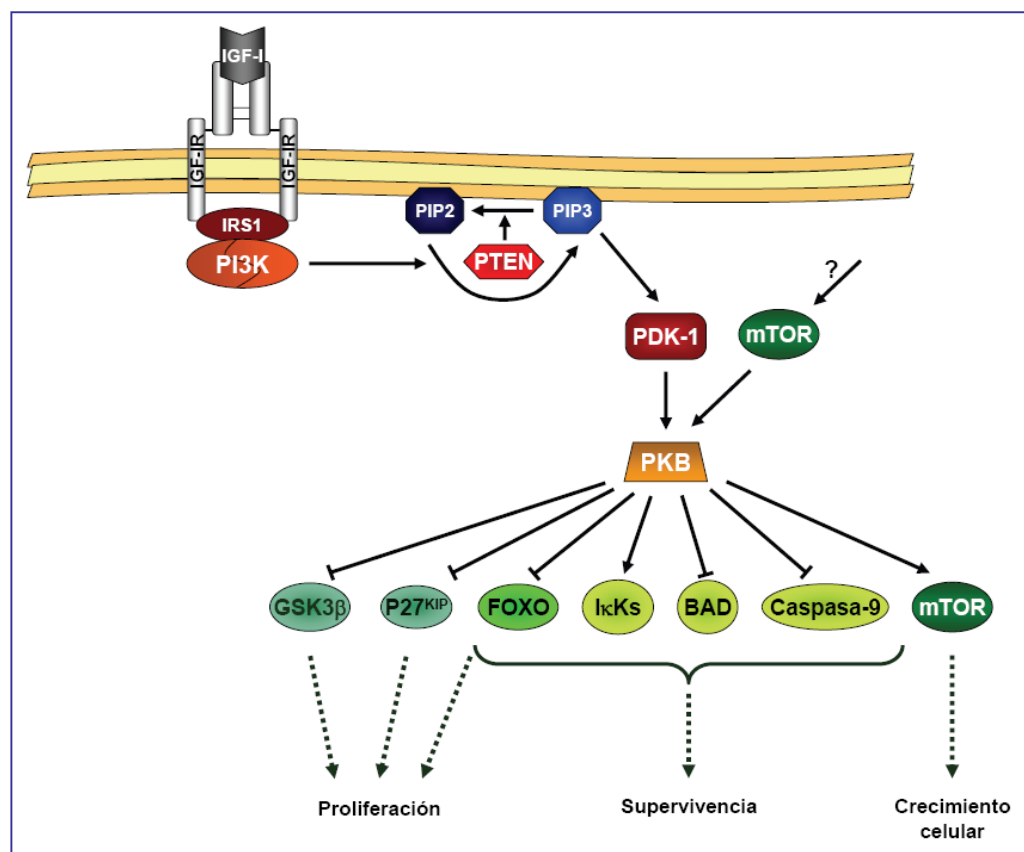


Fig. 9: Ruta de señalización de IGF-1/PI3K y sustratos de PKB. Tras la unión de IGF-1 (Factor de crecimiento similar a insulina-1) a su receptor con actividad tirosina quinasa se produce el reclutamiento de proteínas con dominios SH2 como IRS-1 (Sustrato del receptor de insulina-1) que promueve la activación de la enzima PI3K (Fosfoinositol 3'-Kinasa). Esta enzima fosforila a PIP2 (Fosfoinositol-3,4 bisfosfato) para generar el segundo mensajero PIP3 (Fosfoinositol trifosfato). La reacción opuesta es llevada a cabo por la proteína fosfatasa PTEN (Fosfatasa y homólogo de tensina deletado en el cromosoma 10). PIP3 atrae a PKB (Proteína Kinasa B) y a la enzima PDK1 (Kinasa dependiente de 3'-fosfoinositidos-1) a la membrana, que junto con mTOR (Diana de rapamicina de mamíferos) promueve la activación de PKB y su interacción con sustratos como el propio mTOR, factores de transcripción de la familia FoxO (Forkhead box O), IκKs (Kinasas de inhibidores de NF-κB), BAD (Antagonista de Bcl-2/Bcl-XL, que provoca muerte celular), caspasa-9, p27^{KIP} o GSK3 (Kinasa de glucógeno sintetasa-3) que participan en procesos celulares como la supervivencia, el control de la progresión del ciclo celular o el crecimiento celular. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición.

pliamente distribuidas en tejidos de mamíferos, en contraste con la subunidad p110δ, que presenta una expresión restringida principalmente a leucocitos. Se ha descrito que ligandos que activan a proteínas G heterotriméricas, estimulan la actividad de PI3Ks de la clase IA (Hu, 1996; Kowalski-Chauvel, 1996; Ptaszniak, 1996; Saward, 1997; Thomason, 1994). Concretamente se ha descrito que p110β, pero no p110α o p110δ, puede ser activada por subunidades Gβγ *in vitro* (Kurosu, 1997; Maier, 1999).

La única PI3K de la subclase IB identificada hasta la fecha corresponde a la subunidad catalítica p110γ, que aparece asociada con la subunidad reguladora p101. Los heterodímeros p110γ/p101 son activados por subunidades Gβγ de proteínas G heterotriméricas, siendo la subunidad p101 funda-

mental para esta activación (Krugmann, 1999). Se ha descrito que la PI3K de la clase IB también puede ser activada por subunidades $G\alpha$ (Murga, 1998; Stoyanov, 1995). Esta clase de PI3Ks parece expresarse únicamente en mamíferos, con una distribución tisular restringida principalmente a glóbulos blancos.

La clase II, está formada por las isoformas PI3K-C2 α , PI3K-C2 β y PI3K-C2 γ . Las dos primeras presentan una expresión bastante extendida, en contraste con la PI3K-C2 γ que se expresa principalmente en hígado. Al contrario que las PI3Ks de la clase I, que son primordialmente citosólicas, las de la clase II aparecen principalmente asociadas con la fracción membranosa de la célula (Arcaro, 1998; Prior, 1999). Las PI3Ks de la clase II pueden ser activadas por la insulina, el EGF, el PDGF, las integrinas y la quimioquina MCP-1 (Brown, 1999; Turner, 1998; Zhang, 1998), aunque el mecanismo responsable de esta activación se desconoce.

La clase III de PI3Ks está formada por los homólogos de la proteína Vps34p (“vesicular protein-sorting protein”) (Herman, 1992). Estas PI3Ks presentan al fosfatidilinositol (PtdIns) como único sustrato *in vitro* y probablemente son las responsables de la generación de una gran parte de la fracción de PtdIns(3)P presente en las células. Se ha identificado una subunidad catalítica en todas las especies de eucariotas, tanto en levaduras como en mamíferos esta subunidad catalítica aparece formando un complejo con una quinasa de residuos de Ser/Thr (Vps15p en levaduras, p150 en mamíferos).

5.1.2 Efectores de PI3Ks de la familia IA.

La activación de esta subclase de PI3Ks promueve la fosforilación de PIP2, dando lugar al segundo mensajero PIP3 (Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), que se une a proteínas con dominios PH (Homólogo a pleckstrina). La reacción inversa es llevada a cabo por la fosfatasa PTEN (Fosfatasa y homólogo de tensina deletado en el cromosoma 10), proporcionando un mecanismo de finalización de la señal de la PI3K. Entre las numerosas proteínas que contienen dominios PH de unión con alta afinidad a PIP2/PIP3, se encuentran desde proteínas kinasas (*e.g.*, PKB, PDK1, Btk), factores de intercambio de nucleótidos (GEFs) (*e.g.*, Vav, GRP1, ARNO, citohesina-1, Sos1, Tiam-1), factores activadores de actividad GTPasa (GAPs) (*e.g.*, GAP1m, centaurinas), fosfolipasas (*e.g.*, PLC γ 2), hasta proteínas adaptadoras (Bottomley, 1998; Rameh, 1999). Debido a la presencia de estos dominios PH, la mayoría de estas moléculas se han implicado en la señalización mediada por PI3Ks. De ellas describiremos a la quinasa PKB por su relación con este trabajo.

El nombre de PKB deriva de su homología con PKA y PKC. Es el homólogo celular de la oncoproteína viral v-Akt, de ahí su nombre alternativo c-Akt o Akt. PKB está compuesta por un domi-

nio PH N-terminal, un dominio kinasa y una región reguladora C-terminal. La fosforilación de dos residuos específicos, Thr308 en el dominio kinasa y Ser473 en el dominio C-terminal (numeración de PKB α humano) es necesaria para la activación completa de esta kinasa. El modelo actual propone que PKB es dirigida a la membrana tras su asociación con los PIP3 generados por la PI3K. Una vez en membrana, se produce la fosforilación del residuo de Ser473 por el complejo mTOR (Diana de rapamicina de mamíferos)/Rictor (Sarbasov, 2005), que es seguida de la fosforilación del residuo de Thr308 por PDK1 (Kinasa dependiente de 3'-fosfoinositidos-1) (Vanhaesebroeck, 2000). Se pueden encontrar dianas directas de fosforilación por PKB en muy diversos procesos celulares, un ejemplo es su conocida función en la supervivencia celular, donde PKB es capaz de fosforilar e inhibir a proteínas proapoptóticas como BAD (Antagonista de Bcl-2/Bcl-XL, que provoca muerte celular) (Downward, 1999) o caspasa-9 (Alnemri, 1999). Además PKB puede actuar sobre factores de transcripción de la familia FoxO (Forkhead box O), cuya fosforilación por PKB promueve su salida del núcleo al citoplasma impidiendo su acción transcripcional, implicada en la inducción de la apoptosis y en el control de la proliferación (Brunet, 1999; Kops, 1999). PKB también puede activar a las kinasas de los inhibidores de NF- κ B (I κ Ks) que promueven la activación del factor de transcripción antiapoptótico NF- κ B (Factor nuclear- κ B) (Kane, 1999; Ozes, 1999; Romashkova, 1999). Además se ha demostrado que PKB fosforila e inhibe a GSK3 (Kinasa de glucógeno sintetasa-3) (Cross, 1995) y a p27^{KIP}, ambas implicadas en el control de la progresión del ciclo celular, y activa a mTOR que se ha relacionado con el proceso de traducción de proteínas (Nave, 1999) (Fig. 9).

5.2. Acción de IGF-1 sobre la transcripción génica en tiroides

Insulina/IGF-1 cooperan con la TSH en la regulación de la expresión de los genes marcadores de la diferenciación tiroidea. En nuestro laboratorio se ha demostrado que el tratamiento de células tiroideas de rata con TSH, aumenta los niveles de mRNA de *Tg*, *TPO* y *NIS*. Tanto la insulina como el IGF-1 estimulan la expresión de mRNA de *Tg* y *TPO*. En el caso de la *Tg* (Santisteban, 1987) y de la *TPO* (Zarrilli, 1990), la coestimulación con el IGF-1 induce un aumento aditivo de la transcripción de estos genes. En nuestro grupo se han identificado elementos de respuesta a insulina e IGF-1 dentro de los promotores de *TPO* y *Tg*, implicando al factor de transcripción "forkhead" FoxE1 en la regulación hormonal de ambos genes (Aza-Blanc, 1993; Santisteban, 1992). Además la expresión de FoxE1 es estimulada por cAMP y por insulina/IGF-1. La transcripción del *TSHR* también es inducida por el tratamiento con insulina/IGF-1. Sin embargo, y al contrario del resto de genes marcadores de la diferenciación tiroidea, la transcripción de *NIS* inducida por la TSH, es inhibida por el IGF-1 (García, 2002). Este efecto estaba mediado por la enzima PI3K, ya que su inhibición bloqueaba la represión ejercida por el IGF-1. La acción del IGF-1 sobre la expresión de *NIS* tenía lugar a nivel

transcripcional, y este efecto era reproducido por la expresión de una PI3K activada constitutivamente. Además se delimitó la región del promotor de *NIS* responsable del efecto inhibitor de IGF-1/PI3K. Estos resultados demostraron la implicación de la vía de la PI3K en la represión de la transcripción de *NIS* inducida por la TSH.

Otros indicios sugieren que podría existir una convergencia entre las rutas activadas por la TSH y el IGF-1 en el tirocito (Dremier, 2002). Dada la importancia de la señalización de la TSH y del IGF-1 para la función de la célula tiroidea, es importante la identificación de las moléculas que desempeñan una función facilitando su acción cooperativa.

6. DARPP-32

Un ejemplo de estos integradores es DARPP-32 (Fosfoproteína regulada por dopamina y cAMP de 32kDa), una molécula cuya expresión se describió inicialmente en neuronas dopaminocéptivas de regiones específicas del cerebro (Walaas, 1984), donde actúa como un interruptor molecular integrando señales de diferentes receptores de membrana. Una pléyade de neurotransmisores y neuropéptidos convergen sobre DARPP-32 y afectan a su estado de fosforilación, y a su vez, los niveles de p-DARPP-32 proporcionan un ajustado control de alrededor de una docena de rutas de señalización integradas por proteínas fosforiladas. Se han descrito al menos 10 vías diferentes que afectan a la función de DARPP-32 en neuronas espinosas medianas del estriado (Foubister, 2002), donde su función y regulación han sido ampliamente estudiadas. En la Fig. 10 se puede observar una relación de los estímulos que afectan a la actividad de DARPP-32 en neuronas. Otra serie de estímulos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el ácido retinoico y los estrógenos, si bien no afectan al estado de fosforilación de la proteína, regulan su nivel de expresión tanto *in vivo* como *in vitro* (Ivkovic, 1997; Stroppolo, 2004; Wang, 2005). DARPP-32 está regulada de manera recíproca por los dos neurotransmisores más relacionados con la esquizofrenia: Dopamina y glutamato. La dopamina activa a DARPP-32 a través del receptor D1 y la inactiva a través del receptor D2 (Nishi, 1997). El glutamato actuando a través de los receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) y de AMPA (Acido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico), también inactiva a DARPP-32 (Halpain, 1990). Se han descrito deficiencias en los niveles de DARPP-32 en pacientes con esquizofrenia, en un área del cerebro típicamente afectada por esta enfermedad (Albert, 2002), además se ha demostrado que media la respuesta del cerebro a diferentes drogas de abuso como la cocaína, las anfetaminas, el etanol, el LSD (Dietilamida del ácido lisérgico), el PCP (1-(1-fenilciclohexil)-piperidina), los opiáceos y la nicotina (Svenningsson, 2005). También se ha descrito su importancia mediando el efecto estimulador de la cafeína sobre la actividad motora (Lindskog,

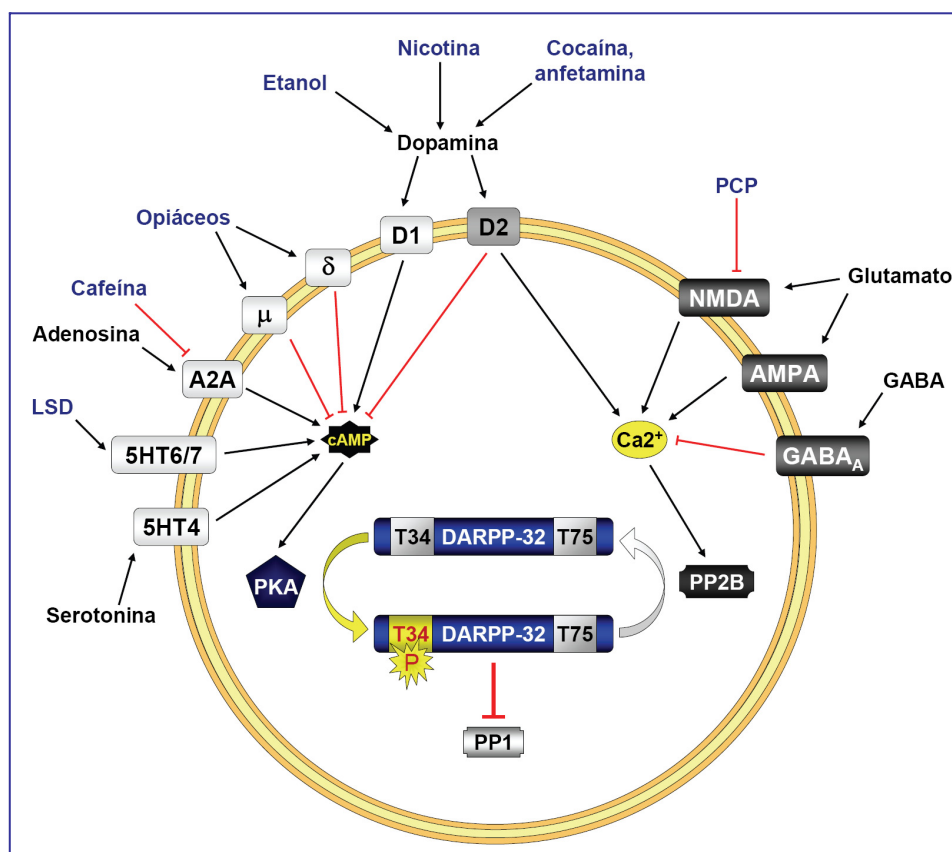


Fig. 10. Relación de estímulos que afectan al nivel de P-Thr34 DARPP-32. Un gran número de neurotransmisores (en negro) y drogas de abuso o psicoestimulantes (en azul) afectan al nivel de P-Thr34 DARPP-32 a través de diversos receptores, controlando la actividad de PP1 y el estado de fosforilación de sus efectores. Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición. LSD: Dietilamida del ácido lisérgico; PCP: 1-(1-fenil-ciclohexil)-piperidina; GABA: Acido γ -aminobutírico; GABA_A: Receptor ionotrópico de GABA tipo A; NMDA: Receptor de N-metil-D-aspartato; AMPA: Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; D1: Receptor de dopamina-1; D2: Receptor de dopamina-2; 5HT4/6/7: Receptor de serotonina-4/6/7.

2002), o de la fluoxetina (Prozac), que pierde sus efectos en ratones que no expresan DARPP-32 (Svenningsson, 2002).

DARPP-32 es la única proteína conocida con capacidad de inhibir alternativamente a una fosfatasa (PP1) o a una kinasa (PKA), ambas con funciones cruciales en la mayoría de tipos celulares. Esta doble función es regulada por mecanismos de fosforilación y desfosforilación (Fig. 11). Cuando DARPP-32 es fosforilada por PKA en el residuo de Thr34, actúa como un inhibidor potente y específico de la PP1 (Hemmings, 1984), mientras que la fosforilación en el residuo de Thr75 dependiente de CDK5 (Kinasa dependiente de ciclina-5) y de su activador p35, la transforma en un inhibidor de la PKA (Bibb, 1999). La desfosforilación de Thr34 está mediada por la PP2B (Proteína fosfatasa-2B, también llamada calcineurina), tras la activación de la vía del Ca^{2+} , mientras que la desfosforilación de Thr75 es potenciada por la PKA mediante la activación de la PP2A (Proteína fosfatasa-2A), lo que genera un mecanismo de retroalimentación positiva de la señal de la PKA (Nishi, 2002). La

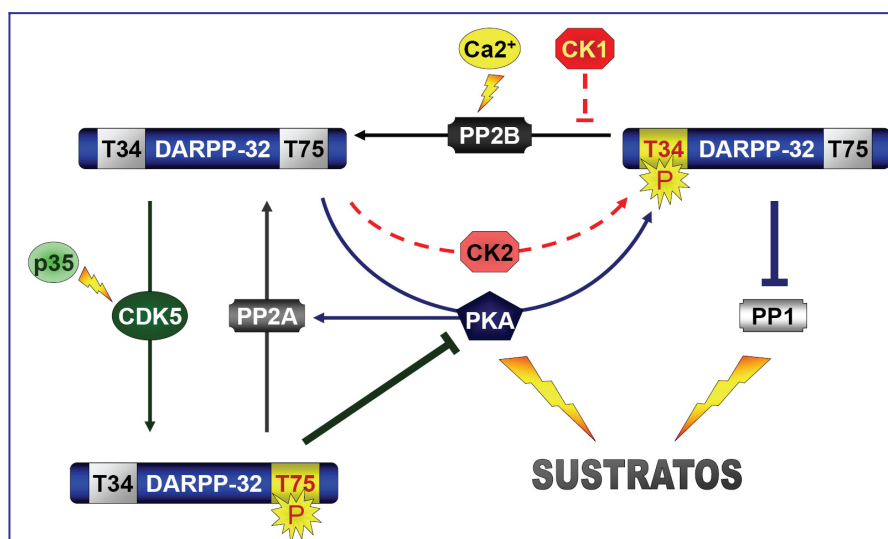


Fig. 11: Regulación de la actividad de DARPP-32. PKA fosforila a DARPP-32 en el residuo de Thr34 (T34) convirtiéndola en un inhibidor de la fosfatasa PP1. La activación de CDK5 por p35 promueve la fosforilación de DARPP-32 en el residuo de Thr75 (T75) dirigiendo su actividad hacia la inhibición de PKA. Las proteínas fosfatasas PP2A y PP2B desfosforilan los residuos de Thr75 y de Thr34 respectivamente. CK1 atenúa la desfosforilación de la Thr34 y CK2 la potencia mediante la fosforilación respectiva de los residuos Ser137 y Ser102 de DARPP-32.

complejidad de este proceso de regulación se ve aumentada por otras fosforilaciones, como la del residuo de Ser102 por la CK2 (Caseína quinasa-2) y del de Ser137 por la CK1 (Caseína quinasa-1), que potencian la fosforilación por la PKA y atenúan la desfosforilación del residuo de Thr34 por la PP2B respectivamente (Greengard, 1999). Por lo tanto estímulos que activan la vía de cAMP/PKA, promueven a su vez la inactivación de la PP1 a través de DARPP-32 y potencian la fosforilación de los sustratos de la PKA. Al contrario estímulos que promueven la inactivación de la PKA impiden a su vez la inhibición de la PP1, potenciando la desfosforilación de sus sustratos. Entre los efectores de la vía D1/DARPP-32 se encuentran la bomba Na^+, K^+ -ATPasa (Nishi, 1999), los canales de calcio (Surmeier, 1995), los canales de sodio dependientes de voltaje (Schiffmann, 1995), la subunidad NR1 del receptor de glutamato NMDA (Snyder, 1998) y factores de transcripción como CREB (Liu, 1996) o c-Fos (Svenningsson, 2000).

Posteriormente se observó su expresión en otros tejidos. Se ha descrito que esta proteína podría jugar un papel importante en el proceso de diferenciación de fibroblastos hacia adipocitos, ejerciendo como mediador de la señal de la insulina sobre la PP1 (Brady, 1997). Fuera del sistema nervioso la mayoría de trabajos han relacionado a DARPP-32, tanto su sobreexpresión como su ausencia, con procesos de transformación. En este sentido se ha detectado la sobreexpresión tanto de la forma completa, como de una isoforma truncada de DARPP-32 en carcinomas gástricos, en los que podría cumplir funciones antiapoptóticas a través de la activación de la vía de la PI3K, fomentando la supervivencia y aumentando la resistencia de estas células frente a diversas drogas antitumorales (Belkhiri, 2008). La sobreexpresión de DARPP-32 también se ha observado en tumores de esófago,

de próstata o de colon (Beckler, 2003). El caso opuesto se ha descrito en células de mama, donde la pérdida de expresión de la proteína en células transformadas se ha relacionado con un aumento de su capacidad migratoria (Hansen, 2006).

Mientras se analizaban las variaciones entre el perfil de expresión génica de células tiroideas diferenciadas y no diferenciadas, en nuestro laboratorio se observó la expresión diferencial de un gen que resultó ser *DARPP-32*. Dada la capacidad de esta molécula a la hora de integrar señales provenientes de numerosos receptores en tejido cerebral y el amplio espectro de acción que presenta actuando sobre numerosas rutas de señalización, su inesperada expresión en tiroides, dependiente del estado de diferenciación de las células, nos planteó la posibilidad de que *DARPP-32* estuviera implicada en el control de la diferenciación celular tiroidea.

Objetivos

1. Análisis de la función de $G\beta\gamma$ sobre el proceso de diferenciación celular tiroidea.

- Determinación de los efectos de los dímeros $G\beta\gamma$ sobre la expresión de NIS.
- Identificación de las subunidades $G\alpha$ activadas por TSH que promueven la liberación de complejos $G\beta\gamma$ y su acción sobre NIS.
- Determinación de la especificidad de acción de los dímeros $G\beta\gamma$ sobre la diferenciación celular tiroidea.
- Análisis de la activación de la PI3K inducida por TSH y de las vías de señalización implicadas.
- Caracterización del mecanismo transcripcional responsable de la inhibición de la expresión de NIS inducida por $G\beta\gamma$. Análisis de los efectos de $G\beta\gamma$ sobre el factor de transcripción Pax8.

2. Caracterización de DARPP-32 en tiroides y determinación de su función sobre la diferenciación celular tiroidea.

- Determinación de la expresión y sublocalización de DARPP-32 en células tiroideas.
- Estudio de la relación entre la expresión de DARPP-32 y el grado de diferenciación celular tiroidea.
- Análisis de la regulación de la expresión de DARPP-32 por TSH e IGF-1: Vías de señalización implicadas.
- Análisis de la regulación de la fosforilación de DARPP-32 inducida por TSH e IGF-1: Vías de señalización implicadas.

Materiales y métodos

1. Materiales

1.1 Líneas celulares

FRTL-5 y PCC13. Líneas celulares epiteliales tiroideas de rata, obtenidas a partir de un cultivo primario de ratas Fischer de 5 a 6 semanas (FRTL-5) o de 18 meses de edad (PCC13). Las células FRTL-5 (ATCC CRL 8305; American Type Culture Collection, Manassas, VA) fueron seleccionadas en un medio Ham's F-12 modificado, en presencia de una mezcla de 6 hormonas o agentes (detallados en la sección de cultivos celulares) y con una baja concentración de suero de ternera para evitar la selección de fibroblastos, mientras que las células PCC13 fueron seleccionadas mediante clonaje celular. Ambas líneas celulares presentan un fenotipo tiroideo inmortalizado, no tumorigénico y diferenciado. Posteriormente y una vez clonados los genes marcadores de la diferenciación tiroidea, se observó que ambas líneas celulares expresaban tanto Tg, TPO, NIS y TSHR como los factores de transcripción TTF-1, FoxE1 y Pax8. Su crecimiento y supervivencia eran dependientes de la presencia de TSH e insulina, siendo esta última un factor permisivo, no mitogénico por sí mismo, y presentaban un periodo de duplicación de 30 ± 40 h en el caso de las células FRTL-5 (Ambesi-Impiombato, 1980) y de 24h en el de las PCC13 (Fusco, 1987).

H-Ras FRTL-5 y K-Ras FRTL-5. Células FRTL-5 transformadas establemente con los oncogenes *v-H-Ras* y *v-K-Ras* respectivamente (Fusco, 1987).

H-Ras PCC13 y K-Ras PCC13. Células PCC13 transformadas establemente con los oncogenes *v-H-Ras* y *v-K-Ras* respectivamente (Fusco, 1987).

FRT (Fischer rat thyroid). Son células que presentan un fenotipo epitelial polarizado (Nitsch, 1985), sin embargo no expresan los marcadores de la diferenciación tiroidea ni los factores de transcripción TTF-1 y FoxE1, aunque si expresan Pax8, por lo que son consideradas células no diferenciadas (Mascia, 1997).

FRO. Línea celular no diferenciada proveniente de un carcinoma anaplásico tiroideo humano (Fagin, 1993).

1.2 Productos

El medio de cultivo Ham's F12 modificado, las hormonas para el mantenimiento y estimulación de las células en cultivo (TSH, insulina, glicil-histidil-lisina, hidrocortisona, transferrina y somatostatina), la forskolina, la albúmina sérica bovina (BSA), la toxina pertúxica (PTX) y el anticuerpo anti-FLAG son de Sigma (St. Louis, MO). El factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1) es de Preprotech (Rocky Hill, NJ). El medio de transfección OPTI-MEM es de Gibco (Invitrogen

(Paisley, UK)). El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) y el suero de ternera son de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD). El agente de transfección FuGene y las columnas "Quick Spin G-25 Sephadex" son de Roche (Basilea, Suiza). Los anticuerpos AlexaFluor488 cabra anti-conejo y AlexaFluor546 cabra anti-ratón, el agente de transfección Oligofectamine y las enzimas de restricción son de Invitrogen (Paisley). Los RNA de interferencia y el "Qiagen plasmid purification kit" son de Qiagen (Chatsworth, CA). Los compuestos H89, LY294002, Wortmanina, IBMX (3-Isobutil-1-metilxantina) y Rp-cAMP, y los anticuerpos anti-fosfo-CREB y anti-CREB1 son de Calbiochem (La Jolla, CA). Las membranas Nytran y Protran de nylon y nitrocelulosa respectivamente son de Schleicher & Schuell (Keene, NH). Los anticuerpos anti- β -actina, anti-Akt1/2 y anti-CD8 α , los anticuerpos anti-IgG de ratón, cabra y conejo acoplados a peroxidasa y el agente de detección Luminol son de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo anti-pAkt (pSer472/473/474) es de Pharmingen (San Diego, CA). El anticuerpo anti-Tg es de DAKO (Glostrup, Dinamarca). Los anticuerpos anti-TTF-1 y anti-Pax-8 son de BioPat (Piedimonte Matese, Italia). El medio de montaje para las inmunofluorescencias Vectashield es de Vector Laboratories (Burlingame, CA). Las películas autorradiográficas son de Konica Minolta Medical & Graphic, Inc. (Tokio, Japon). Las enzimas GoTaq Flexi DNA polymerase, RQ1 RNasa-free DNase, T4 polinucleótido quinasa y M-MLV RT, y los sistemas comerciales "Dual-Luciferase assay system" y "TNT quick" son de Promega Corp. (Madison, WI). Los sistemas comerciales "Ready-To-Go" y "cAMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System (dual Range)" son de Amersham (General Electric Healthcare (Buckinghamshire, UK)). El sistema "Bio-rad protein assay" es de Bio-rad Laboratories (Hercules, CA). Las columnas Microspin S-300 HR son de Pharmacia (Pfizer (New York, NY)). La TSH recombinante humana fue donada por Genzyme (Madrid). Los anticuerpos anti-DARPP-32 y anti-P-Thr34-DARPP-32 fueron donados por el Dr. Paul Greengard (Laboratory of Molecular and Cellular Neuroscience, Rockefeller University, New York, NY). El anticuerpo anti-NIS fue donado por la Dra. Nancy Carrasco (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY). La toxina colérica fue donada por la Dra. María José Toro (Universidad de Alcalá de Henares, Madrid).

1.3 Plásmidos

pRL-TK: Plásmido de expresión constitutiva que contiene el vector de expresión de la proteína renilla controlado por el promotor de la timidina kinasa del virus HSV. Se utilizó para determinar la eficiencia de la transfección en los ensayos de actividad de promotores.

pNIS-2.8: Vector de expresión del gen reportero de la luciferasa bajo el control de un fragmento de 2.854pb del promotor de *NIS* de rata, conteniendo la región NUE (NIS upstream enhan-

cer) donde se unen los factores de transcripción TTF-1 y Pax8. Este vector fue clonado en nuestro laboratorio (García, 2002).

hTGeng/prm-Luc: Vector de expresión del gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de *Tg* humano, donado por el Dr. S. Refetoff (University of Chicago) y descrito en la siguiente referencia (Pohlenz, 2002).

pTPO-Luc: Vector de expresión de la luciferasa bajo el control de 400pb del promotor de la *TPO* de rata. Descrito previamente en la siguiente referencia (Francis-Lang, 1992a).

3XCRE-Luc: Vector de expresión de la luciferasa controlado por tres elementos de respuesta a cAMP (CRE) dispuestos en tándem (Fernández, 2005). Este vector fue cedido por la Dra. L. Cacicedo (Hospital Ramón y Cajal, Madrid).

pTTF-1: cDNA del factor de transcripción TTF-1 clonado en el vector pBluescriptII(KS-). Fue cedido por el Dr. R. Di Lauro (Stazione Zoologica A. Dohr, Nápoles) y se describe en la siguiente referencia (Guazzi, 1990).

FLAG-Gβ1: Vector de expresión de la subunidad Gβ1 humana, fusionada en su extremo N-terminal con el epítipo FLAG. Clonado en un vector pcDNA3.1+. Fue obtenido del Guthrie cDNA Resource Center (Sayre, PA).

HA-Gγ2: Vector de expresión de la subunidad Gγ2 humana, fusionada en su extremo N-terminal con el epítipo hemaglutinina (HA). Clonado en un vector pcDNA3.1+. Fue obtenido del Guthrie cDNA Resource Center (Sayre, PA).

pCISGalphaT-1: Vector de expresión de la subunidad Gα de la Transducina bovina.

CD8: Vector de expresión que contiene los dominios extracelular y transmembrana del receptor específico de linfocitos CD8, se utilizó como vector control en experimentos de transfección.

CD8-βARK: Vector construido a partir del vector de expresión de CD8, que expresa una molécula quimérica formada por CD8, para dirigir la proteína a membrana, y el fragmento C-terminal de la quinasa del receptor β-adrenérgico 1 (βARK1), que contiene la región de unión con alta afinidad a dímeros Gβγ. Los 3 últimos vectores fueron donados por el Dr. F. Mayor Jr. y la Dra. C. Murga (CBM, CSIC, Madrid).

pSuperGFP-Luc (pSGL) y pSuperGFP-DARPP-32 (pSGD): Para la construcción de estos plásmidos se eliminó el sitio de clonado múltiple del vector pEGFP-C3 (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), mediante la digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Bgl*III, se-

guida de la religación del plásmido. A continuación este vector fue digerido con las enzimas *AseI*/*MluI* para extraer el fragmento CMV-GFP-poliA, que fue posteriormente clonado en el sitio de corte de *SmaI* de los plásmidos pSuper y pSuper-Luc (Oligoengine, Seattle, WA), generando respectivamente la construcción intermedia pSuperGFP (pSG) y la construcción final pSuperGFP-Luc (pSGL). Para la generación del vector de expresión del RNA de interferencia de DARPP-32 se diseñaron dos oligonucleótidos (Sección 1.4.3 de los Materiales) que fueron anillados y fosforilados utilizando la enzima T4 polinucleótido kinasa e introducidos en los sitios *BglIII*/*HindIII* del vector pSG, generando la construcción final pSuperGFP-DARPP-32 (pSGD).

pEGFP-DARPP-32: El vector de expresión de la molécula quimérica GFP-DARPP-32 fue construido clonando el gen de DARPP-32 en los sitios *BglIII*/*EcoRI* del vector pEGFP-N1 (CLONTECH Laboratories, Inc.).

1.4 Oligonucleótidos

1.4.1 Transcripción reversa y amplificación por PCR (RT-PCR).

-Cebador para $G\gamma 2$. Utilizado para la retrotranscripción del RNA de $G\gamma 2$.

5'-TCTTCCTTGGCATGTGCTT- 3'

-Cebadores para HA- $G\gamma 2$. Se utilizaron para la amplificación específica del DNA de HA- $G\gamma 2$ obtenido en el proceso de retrotranscripción, evitando así la amplificación del DNA de las posibles subunidades $G\gamma 2$ expresadas endógenamente.

HA: 5'-CCCATACGATGTTCCAGAT- 3'

$G\gamma 2$: 5'-TCTTCCTTGGCATGTGCTT- 3'

1.4.2 Ensayos de retardo en gel (EMSA).

-Secuencia que pertenece al sitio PB de unión de Pax8 a la región NUE del promotor de *NIS* (Ohno, 1999):

5'-GGGGTGGTTGCGCATGGACAGTCCCTG- 3'

1.4.3 Generación del vector de expresión del RNA de interferencia de DARPP-32.

-Para construir el vector de expresión del RNA de interferencia de DARPP-32 se diseñaron dos secuencias de oligonucleótidos que fueron sintetizadas por Qiagen:

5' -GATCCCAAGTCGAAGAGACCCAACCTTCAAGAGAGGTTGGGTCTCTTCGACTTTTTTTGGAAA-3'

5' -AGCTTTTCCAAAAAAGTCGAAGAGACCCAACCTCTCTTGAAGGT TGGGTCTCTTCGACTTGGG-3'

1.4.4 RNA de interferencia para eliminar la expresión de DARPP-32 y oligonucleótidos control.

-Oligonucleótidos de RNA para interferir la expresión de DARPP-32:

r(CCCCUGCCUUGCUGUCCG)d(TT)

r(CGGAACAGCAAGGCAGGGG)d(TT)

-Oligonucleótidos control:

r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)d(TT)

r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)d(TT)

Fueron obtenidos de Qiagen e hibridados siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.5 Medios instrumentales

- La actividad renilla y luciferasa se determinó utilizando un luminómetro Biolumat de Berthold (Bad Wildbad, Alemania).

-El análisis de la actividad radiactiva de membranas en los ensayos de Northern-blot se realizó con un InstantImager de Packard (Meriden, CT).

-Para la fijación del RNA a las membranas de nitrocelulosa, se utilizó un horno de UV "Stratalinker UV-Crosslinker" (Stratagene, La Jolla, CA).

-La concentración de DNA y RNA se determinó mediante un espectrofotómetro "Gene Quant" de Pharmacia (Pfizer (New York, NY)).

-La cuantificación de la actividad radiactiva de líquidos se llevó a cabo utilizando un contador de centelleo 1209 RACKBETA de Perkin Elmer (Waltham, MA).

-Centrífuga GS-15R y ultracentrífugas J2-21MIE y Avanti J-25 de Beckman Coulter (Fullerton, CA).

-Microscopio confocal (Leica Corp., Deerfield, IL).

-Microscopio de fluorescencia (Axiophot; Carl Zeiss, Thornwood, NY).

-Las imágenes del microscopio de fluorescencia fueron tomadas con una cámara Olympus DP70 (Olympus Corp., Lake Success, NY) utilizando el software DP70-BSW.

-El DNA fue amplificado con el sistema de PCR “Thermo Cycler 2720” de Applied Biosystems (Foster City, CA).

-La determinación de la distribución del ciclo celular mediante ensayos de citometría de flujo se realizó con un analizador celular activado por fluorescencia (BD Biosciences, San Jose, CA).

-La cuantificación de la concentración de proteínas se determinó con un lector de ELISA de Molecular Devices (Sunnyvale, CA).

-Las bandas inmunoreactivas en los ensayos de Western-blot se cuantificaron densitométricamente con el programa informático Image Quant (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA).

-La significancia estadística de los datos obtenidos fue determinada con el programa informático GraphPad Prism (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

-Los datos obtenidos en los ensayos de citometría de flujo fueron procesados con el programa informático Cell Quest Pro (BD Biosciences, San Jose, CA).

2. Métodos

2.1 Cultivos celulares

Las células FRO fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%.

Las líneas celulares FRT, FRTL-5, PCCI3 y FRTL-5 y PCCI3 transformadas con los oncogenes *H* y *K-Ras* fueron cultivadas en medio Ham's F-12 Coon's suplementado con suero de ternera al 5% y los compuestos u hormonas: Somatostatina 10ng/ml, transferrina 5µg/ml, hidrocortisona 10nM, glicil-L-histidil-L-lisina 10ng/ml, TSH 1nM e insulina 10µg/ml. A lo largo de este trabajo este medio es referido como “6H”.

Para determinar el efecto de los distintos estímulos sobre las líneas diferenciadas (FRTL-5 y PCCI3), éstas fueron mantenidas en el medio anterior, aunque en ausencia de TSH e insulina y con

una concentración mínima de suero (0,2%), durante un tiempo variable de 48h a 8días dependiendo de las condiciones requeridas para cada experimento. A lo largo de este trabajo este medio es referido como “4H”. Las células mantenidas en este medio presentan una proliferación mínima y no expresan los marcadores de diferenciación tiroideos.

A continuación se muestra una relación de los compuestos y concentraciones utilizados en este trabajo:

- a) TSH bovina. Utilizada a una concentración final de 1nM (0,5mU/ml).
- b) TSH recombinante humana (hrTSH). Se empleó a concentraciones finales de 0,1 a 1µg/ml.
- c) IGF-1 (Factor de crecimiento similar a insulina). Se usó a una concentración final de 100ng/ml.
- d) Forskolina. Activador de la adenilato ciclasa. Fue utilizado a concentraciones finales de 1 a 10µM.
- e) H-89. Inhibidor de la PKA que fue utilizado a una concentración final de 10µM.
- f) Rp-cAMP. Análogo competidor del cAMP utilizado a concentraciones finales de 10 a 30 µM.
- g) LY294002. Inhibidor de la PI3K que fue utilizado a concentraciones de 1 a 20µM.
- h) Wortmanina. Inhibidor de la PI3K empleado a concentraciones finales de 25 a 100nM.
- i) IBMX (3-Isobutil-1-metilxantina). Inhibidor no específico de fosfodiesterasas utilizado a una concentración final de 0,5mM.
- j) Toxina pertúxica (PTX). Actúa ribosilando residuos de ADP de las subunidades G α i, impidiendo su unión al receptor y por tanto su actividad señalizadora. Fue añadido al medio 24h antes de los diferentes estímulos a una concentración de 100ng/ml.
- k) Toxina colérica (CTX). Actúa ribosilando residuos de ADP de las subunidades G α s, disminuyendo su actividad GTPasa intrínseca y promoviendo su activación constitutiva. Fue añadida al medio durante 24h a una concentración final de 200ng/ml.

2.2 Transfecciones

2.2.1 Transfecciones de vectores de expresión de siRNA y de oligorribonucleótidos de interferencia.

Para el análisis microscópico de los experimentos de RNA de interferencia, se sembraron alrededor de 10^4 células PCC13 sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos. Tras 24h, las células fueron transfectadas utilizando FuGene, siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada experimento, 12 pocillos fueron transfectados con la construcción control pSGL que transcribe el RNA de interferencia de la luciferasa y 12 pocillos fueron transfectados con la construcción pSGD que transcribe el RNA de interferencia de DARPP-32. La eficiencia de la transfección se determinó mediante la detección de GFP por inmunofluorescencia o Western-blot. Alternativamente las células se transfectaron con oligorribonucleótidos de RNA de interferencia, bien control o bien específicos para DARPP-32, utilizando Oligofectamine y siguiendo las indicaciones del fabricante. El medio de cultivo se renovó 24h más tarde y en adelante cada 2 días. Las células transfectadas con el RNA de interferencia se recogieron de 1 a 7 días después de la transfección para su análisis mediante inmunofluorescencia o Western-blot.

2.2.2 Transfecciones para evaluar la actividad de promotores.

En los experimentos de análisis de la actividad de promotores, se sembraron 6×10^5 células PCC13 en placas de 60mm de diámetro 48h antes de la transfección. Después de un tiempo mínimo de 3h en medio DMEM con HEPES 10mM a pH7,35, las células fueron transfectadas por coprecipitación con fosfato de calcio como ha sido descrito previamente (Chen, 1988). En los análisis de actividad de promotores de *NIS*, *Tg* y *TPO* y de actividad CRE-Luc las células fueron transfectadas con 3 ó 5 μ g del vector de expresión de la luciferasa bajo el control de dichos promotores. Para controlar la eficiencia de la transfección, se añadieron 0,5 μ g del vector pRL-TK. Las cotransfecciones con otros vectores y sus cantidades se indican en cada experimento. Después de 24h las células se cultivaron en un medio 4H de 48 a 72h. A continuación las células fueron tratadas con los diferentes estímulos y compuestos durante 24 ó 48h, y finalmente fueron recogidas y resuspendidas en tampón de lisis pasiva para el análisis de la actividad renilla y luciferasa. La actividad del promotor se determinó como la relación entre la actividad luciferasa y la actividad renilla. La expresión de los vectores transfectados se determinó mediante Western-blot o RT-PCR. Los resultados muestran la media \pm S.D. de un ensayo realizado por triplicado, representativo de al menos tres experimentos independientes.

2.2.3 Transfecciones para ensayos de Western-blot.

Las células fueron transfectadas con los vectores de expresión que se indican en cada experimento, utilizando el método descrito en la sección anterior. Posteriormente fueron cultivadas de 48h a 8 días en medio 4H y a continuación fueron tratadas con los estímulos y agentes indicados en cada experimento.

2.3 Métodos de detección de mRNA

2.3.1 Extracción del RNA.

Cada tipo celular fue cultivado en el medio que se indica en la sección de “Cultivos celulares”, o en medio 4H cuando se evaluó el efecto de diferentes estímulos. Posteriormente el RNA fue aislado por el método de fenol-tiocianato-guanidinium (Chomczynski, 1987). La concentración de las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 260nm.

2.3.2 Northern-Blot

2.3.2.1 Electroforesis y transferencia.

El RNA (20µg) fue separado en un gel de agarosa al 1% y formaldehído 2,2M. Este gel fue posteriormente transferido a una membrana Nytran siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras la transferencia el RNA fue fijado a la membrana con luz ultravioleta en un horno “Stratalinker UV-Crosslinker”. La integridad del RNA y la carga equivalente de los distintos carriles fue determinada mediante la tinción de la membrana con azul de metileno.

2.3.2.2 Obtención y marcaje de la sonda.

Se empleó una sonda específica de DARPP-32 de rata que se marcó con ($\alpha^{32}P$)-dCTP mediante el sistema comercial “Ready-To-Go” utilizando el método de cebadores aleatorios. Posteriormente la sonda marcada fue purificada con columnas Microspin S-300 HR.

2.3.2.3 Hibridación, lavado de las membranas y detección.

Las membranas se prehibridaron durante un mínimo de 4h con una mezcla que contiene formamida al 50%, Denhardt 5X, SSC5X, SDS al 0,5% y 200µg/ml de DNA de espermatozoos de salmón. A continuación las membranas se hibridaron en presencia de 5ml de la mezcla de prehibridación, que

contiene aproximadamente 1×10^6 cpm/ml de la sonda marcada, durante al menos 12h a 42°C. Para eliminar el exceso de radiactividad inespecífica las membranas se lavaron con una solución con SSC 2X y SDS al 0,1% dos veces a temperatura ambiente y dos veces a 42°C. Finalmente el nivel de RNA hibridado con la sonda fue visualizado utilizando un “InstantImager” y posteriormente mediante autorradiografía.

2.3.3 RT-PCR

El RNA total fue tratado con DNAsa RQ1, siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar los restos de DNA. La transcripción reversa (RT) del RNA se realizó como se describe a continuación: El cDNA fue incubado en un volumen total de 20µl, en presencia de 400ng de RNA total, 5pmol de un cebador reverso específico, 200U de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT), 40U del inhibidor de RNAsas (RNasin) y dNTPs 1mM, durante 1h a 42°C en el tampón de reacción suministrado por el fabricante (tras una incubación previa de 10min a temperatura ambiente para permitir la hibridación del cebador). El proceso fue detenido mediante la inactivación de la transcriptasa reversa a 95°C.

La amplificación de los fragmentos seleccionados de cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue llevada a cabo en una mezcla de 25µl que contenía 2,5µl del producto de la reacción de transcripción reversa, 0,625U de GoTaq Flexi DNA polimerasa, MgCl₂ 1,25mM, dNTPs 1mM en el tampón de reacción Green Go Taq Reaction Buffer con 12,5pmoles de cada cebador. La amplificación se realizó durante 40 ciclos; cada ciclo incluyendo: Desnaturalización durante 30s a 92°C, hibridación de los cebadores durante 45s a 60°C y elongación de los cebadores durante 1,5min a 72°C.

2.4 Métodos de detección de proteínas

2.4.1 Western-blot

2.4.1.1 Extracción de proteínas

Los extractos totales de proteína fueron obtenidos recogiendo las células en tampón de lisis RIPA, que contiene Nonidet NP-40 al 1%, deoxicolato sódico al 0,5% y SDS al 0,1%, en PBS 1X. Los extractos celulares fraccionados (citoplásmicos o nucleares) fueron obtenidos según el método de Dignam *et al.* (Dignam, 1983) y los extractos de membrana se aislaron siguiendo el procedimiento descrito por García y Santisteban (García, 2002). La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el sistema comercial “Bio-rad protein assay”

y empleando concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) para el cálculo de la curva patrón.

2.4.1.2 Electroforesis y transferencia

Los extractos de proteínas (de 5 a 30 μ g) fueron separados en geles de SDS-PAGE con concentraciones variables de acrilamida (del 5 al 12%) y transferidos a una membrana de nitrocelulosa.

2.4.1.3 Inmunodetección y cuantificación

Las membranas fueron bloqueadas 1h a temperatura ambiente, con una solución de PBS-T (PBS a pH7,5 con Tween-20 al 0,1%) con leche desnatada al 5%. Tras la incubación O/N a 4°C o durante 2h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo, se realizaron 4 lavados de 10min con PBS-T, seguidos de una incubación de 1h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido en la solución de bloqueo, tras lo que se realizaron 4 nuevos lavados de 10min con PBS-T. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante autorradiografía utilizando el agente de detección de Western-blot Luminol.

Se muestra un ensayo de Western-blot representativo de al menos 3 experimentos independientes. En algunos ensayos el programa Image Quant se utilizó para cuantificar densitométricamente los niveles de proteína. En estos casos, la gráfica que acompaña al ensayo de Western-blot representa la media \pm S.D. de los niveles relativos de la proteína de interés con respecto a los del control de carga, realizada a partir de, al menos, 3 experimentos independientes.

2.4.2 Inmunofluorescencia indirecta

Las células sembradas en cubreobjetos fueron lavadas 3 veces con tampón PBS-T y fijadas con metanol a -20°C durante 10min. Después de 3 nuevos lavados se realizó un bloqueo con tampón PBS con Tween-20 al 0,05% y suero de ternera al 5% durante 1h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 20min a temperatura ambiente, seguida de 3 lavados de 10min con PBS-T y de una incubación de 1h con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor488 goat anti-rabbit (verde) o Alexa Fluor546 goat anti-mouse (rojo). Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda para evitar el secado de los cubreobjetos. Tras un nuevo proceso de lavado con PBS-T, se procedió a la preparación de los cubreobjetos en medio de montaje Vectashield, que contenía 4-,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la tinción nuclear.

Las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia utilizando un objetivo X63 ó X100 con aceite de inmersión, o al microscopio confocal bajo un objetivo X63. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Olympus DP70 utilizando el software DP70-BSW.

2.4.3 Ensayo de retardo en gel (EMSA)

Técnica utilizada para detectar la presencia de proteínas que, en determinadas condiciones establecidas en el ensayo, se unen a secuencias del DNA de manera específica. La unión es visible por el marcaje radiactivo del oligonucleótido con γ -³²P-ATP, que es incubado junto con los extractos nucleares, y resuelto por electroforesis en un gel de poliacrilamida. Las proteínas unidas al DNA producen un retraso en la migración del oligonucleótido con respecto al DNA libre.

2.4.3.1 Preparación de los extractos nucleares

Los extractos nucleares de células PCC13 fueron obtenidos siguiendo el procedimiento descrito por Andrews y Faller (Andrews, 1991). La concentración de proteína fue cuantificada como se describe en el apartado 2.4.1.1.

2.4.3.2 Marcaje de los oligonucleótidos

Se marcaron 100ng de uno de los oligonucleótidos con 25 μ Ci de γ ³²P-ATP utilizando la enzima T4 polinucleótido kinasa. Tras la hibridación de la cadena complementaria por incubación a temperaturas decrecientes en presencia de ATP y NaCl, el oligonucleótido marcado se purificó a través de una columna “Quick Spin G-25 Sephadex”.

2.4.3.3 Unión de las proteínas al DNA

Para promover la unión de las proteínas al DNA, se incubaron 7 μ g de extractos nucleares con los oligonucleótidos marcados (35.000cpm por muestra) en un tampón que contenía Hepes 40mM, pH7,9, KCl 200mM, EDTA 0,2mM, ditiotreitól 0,5mM, poli(dI-dC) 150ng/ μ l y Ficoll al 5% durante 30min a temperatura ambiente.

Para determinar si la unión de la proteína a la secuencia del DNA era específica, se llevaron a cabo competiciones con el mismo o con otros oligonucleótidos no relacionados y sin marcar, que fueron añadidos en un exceso de entre 50-100 veces con respecto al oligonucleótido marcado. Para

realizar estas competiciones, los extractos nucleares fueron incubados previamente con los oligonucleótidos no radiactivos durante 15min en hielo, antes de añadir los oligonucleótidos marcados. Con el mismo propósito se realizaron competiciones con un anticuerpo específico dirigido contra el sitio de unión de la proteína al DNA.

2.4.3.4 Electroforesis y detección

Para la separación de los complejos formados, las muestras se sometieron a un proceso de electroforesis en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris borato-EDTA 0,5X. Previamente el gel fue equilibrado mediante una electroforesis de 15min a 20mA y 4°C. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se secó al vacío y se expuso a -70°C con una película autorradiográfica.

2.5 Citometría de flujo

Se sembraron células PCC13 a una densidad de 6×10^5 células en placas cultivo de 60mm de diámetro y se mantuvieron en medio 6H (Control) durante 3 días, o en medio 4H durante 2, 4 ó 6 días. Tras el tratamiento las células fueron tripsinizadas y recolectadas. Tras 3 lavados con PBS a 4°C las células fueron fijadas O/N con etanol al 70% a -20°C. Después de 3 nuevos lavados con PBS frío, se procedió a la tinción del DNA celular con yoduro de propidio (PI) a una concentración de 15µg/ml. Se analizaron al menos 10.000 eventos de cada muestra y la distribución del ciclo celular se determinó mediante un analizador celular activado por fluorescencia. Los datos fueron procesados utilizando el programa Cell Quest Pro.

2.6 Medida de cAMP

Las determinaciones de los niveles de cAMP se realizaron utilizando el sistema “cAMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System (dual Range)” siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de añadir el estímulo, las células transfectadas fueron tratadas con el inhibidor de fosfodiesterasas IBMX, a una concentración de 0,5mM durante 30min, para evitar la degradación del cAMP generado. A continuación las células fueron lisadas y el extracto resultante fue añadido a una multiplaca de 96 pocillos cubierta con un anticuerpo anti-conejo. Seguidamente se incubó con antisuero de conejo dirigido contra cAMP durante 2h a 4°C. Pasado este tiempo las muestras fueron incubadas con cAMP conjugado con peroxidasa durante 1h a 4°C y se realizaron 4 lavados con la solución de lavado suministrada por el fabricante. Inmediatamente después se añadió el sustrato enzimático que fue incubado durante 1h a temperatura ambiente. Previamente a la determinación de la densidad óptica

en un lector de placas a 450nm de longitud de onda, la reacción fue detenida añadiendo H₂SO₄ 1M. En paralelo, se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de cAMP que abarcaron un rango de 12,5 a 3.200 fmol/pocillo. Los resultados muestran la media \pm S.D. de un ensayo realizado por triplicado representativo de al menos tres experimentos independientes.

2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism. La significancia estadística de los resultados se determinó mediante el método de *t*-test (two-tailed) y las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (*): $p < 0,05$; (**): $p = 0,01$ a $0,001$; (***): $p < 0,001$.

Resultados

1. FUNCION DE LOS DIMEROS $G\beta\gamma$ EN LA DIFERENCIACION CELULAR TIROIDEA

1.1 La expresión de complejos $G\beta 1\gamma 2$ disminuye la expresión de *NIS* en células tiroideas

Tras la unión de la TSH a su receptor de membrana, el complejo heterotrimérico de proteínas G acoplado al receptor, se disocia liberando por un lado a la subunidad $G\alpha$ activada y por otro al dímero $G\beta\gamma$. El TSHR se asocia principalmente a proteínas de la familia G_s , que inducen la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC), promoviendo aumentos en los niveles intracelulares del cAMP, que es el segundo mensajero que controla la mayoría de procesos biológicos de la célula tiroidea, incluyendo la inducción de la expresión de *NIS*. El papel de las subunidades $G\beta\gamma$ liberadas en respuesta a TSH se desconoce, pero uno de los efectores de los dímeros $G\beta\gamma$, la kinasa lipídica PI3K disminuye la expresión de *NIS* inducida por TSH (García, 2002).

Para iniciar el estudio de la función de $G\beta\gamma$ sobre la diferenciación de la célula tiroidea, se analizó el efecto de los dímeros $G\beta\gamma$ sobre la transcripción de *NIS* inducida por TSH o forskolina, un activador directo de la AC. Con este fin se transfectaron células PCCl3 con un vector de expresión del gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de *NIS* (pNIS-2.8) y con concentraciones crecientes de los vectores de expresión de las subunidades $G\beta 1$ y $G\gamma 2$, fusionadas respectivamente a los epítomos FLAG y HA para permitir su detección. Como control de la eficiencia de la transfección se muestra la inmunodetección de la subunidad FLAG- $\beta 1$ del complejo heterodimérico. Tras la transfección, las células fueron cultivadas durante 3 días en medio 4H para inducir su entrada en una fase de quiescencia. En este estado las células presentan una tasa de proliferación mínima y una expresión basal o ausente de los marcadores de la diferenciación tiroidea (Santisteban, 1987). Transcurrido este período las células se trataron durante 24h con TSH o forskolina a concentraciones de 1nM y 10 μ M respectivamente.

La expresión de complejos $G\beta 1\gamma 2$ provocó una reducción significativa y dependiente de dosis de la actividad del promotor de *NIS* inducida por TSH o forskolina, indicando que la señalización desencadenada por $G\beta 1\gamma 2$ interfería con la inducción de la expresión de *NIS* mediada por cAMP (Fig. 12).

La detección de la subunidad HA- $\gamma 2$ mediante Western-blot no fue posible, probablemente debido a la elevada inespecificidad de los anticuerpos utilizados. En su lugar la expresión del vector que codifica para la subunidad HA- $\gamma 2$ fue demostrada mediante RT-PCR (Fig. 13), utilizando preparaciones de RNA de un ensayo realizado bajo las mismas condiciones que el de la Fig. 12. Como control negativo se utilizaron extractos de RNA de células sin transfectar, creciendo en medio 6H

(C), y de células transfectadas con el vector control pcDNA3.1 y tratadas con TSH durante 24h. Como control del tamaño del fragmento amplificado, se muestra la amplificación por PCR del vector de expresión de HA- γ 2 (+). La fidelidad de la PCR fue controlada utilizando H₂O como muestra (-). Una vez demostrada la expresión dependiente de dosis de HA- γ 2, en los experimentos sucesivos sólo se mostrará la inmunodetección de la subunidad FLAG- β 1.

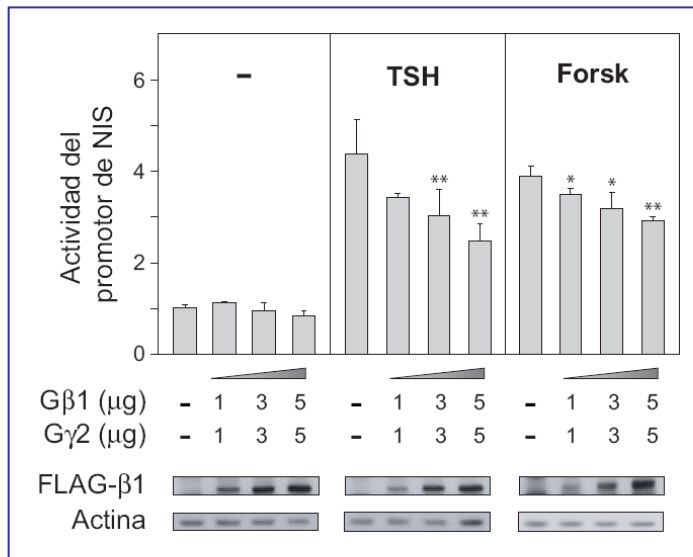


Fig. 12. Regulación de la actividad del promotor de NIS por G β 1 γ 2.

Se transfectaron células PCCL3 con 5 μ g de pNIS-2.8, 0,5 μ g de pRL-TK y 1, 3 ó 5 μ g de los vectores de expresión de FLAG- β 1 y HA- γ 2, o del vector control pcDNA3.1. Tras la transfección, las células fueron cultivadas durante 48h en medio 4H y posteriormente se mantuvieron en estas condiciones (-) o fueron tratadas con TSH o forskolina (Forsk) durante 24h. Transcurrido este tiempo las células fueron recogidas para la determinación de la actividad luciferasa y renilla. La actividad relativa de luciferasa se calculó como unidades de luz normalizadas con respecto a la actividad renilla generada a partir del vector pRL-TK. La actividad del promotor de NIS es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células sin tratamiento y transfectadas con el

vector control. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante un análisis *t*-test (two-tailed). Las diferencias con respecto a las células transfectadas con el vector control (-) y bajo los mismos tratamientos, se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (*): $p < 0,05$; (**): $p = 0,01$ a 0,001. Los mismos extractos de proteína se utilizaron para la detección, mediante Western blot, de FLAG- β 1 y de actina, y se muestran en la parte inferior de la figura.

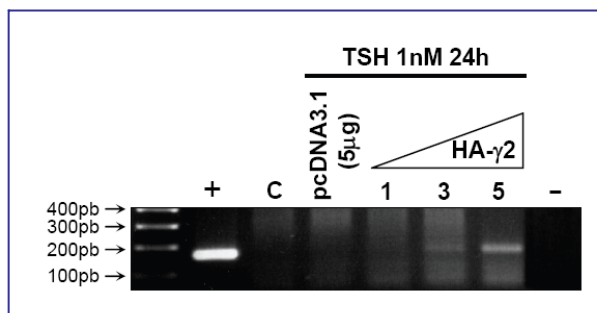


Fig. 13. Control de la expresión de HA- γ 2.

RT-PCR representativa de un experimento realizado con células PCCL3 cultivadas bajo las mismas condiciones que las de la Fig. 12. Se utilizaron cebadores para la amplificación específica de HA fusionado a G γ 2. La amplificación del vector de expresión de HA- γ 2 se utilizó como control del tamaño del fragmento amplificado (+). Como control negativo se utilizaron preparaciones de RNA de células PCCL3 cultivadas en medio 6H y sin transfectar (C) o de células PCCL3 transfecta-

das con el vector control pcDNA3.1 y tratadas con TSH durante 24h. Para controlar la fidelidad del ensayo de PCR se utilizó H₂O destilada (-) como muestra.

Puesto que la actividad del promotor de NIS se hallaba reducida en células que expresaban G β 1 y G γ 2, se analizó si, en consecuencia, los niveles endógenos de proteína también disminuían. Para ello, se transfectaron células PCCL3 con 5 μ g de los vectores de expresión de FLAG- β 1 y HA- γ 2, o con el vector control pcDNA3.1. Tras 5 días en un medio 4H, para conseguir una reducción adecuada de los niveles de NIS, las células se trataron con TSH o forskolina durante 24h y a continua-

ción fueron recogidas para la detección de la expresión de NIS mediante Western-blot. El aumento de NIS inducido por TSH o forskolina estaba significativamente reducido en células que expresaban dímeros G β 1 γ 2 (Fig. 14).

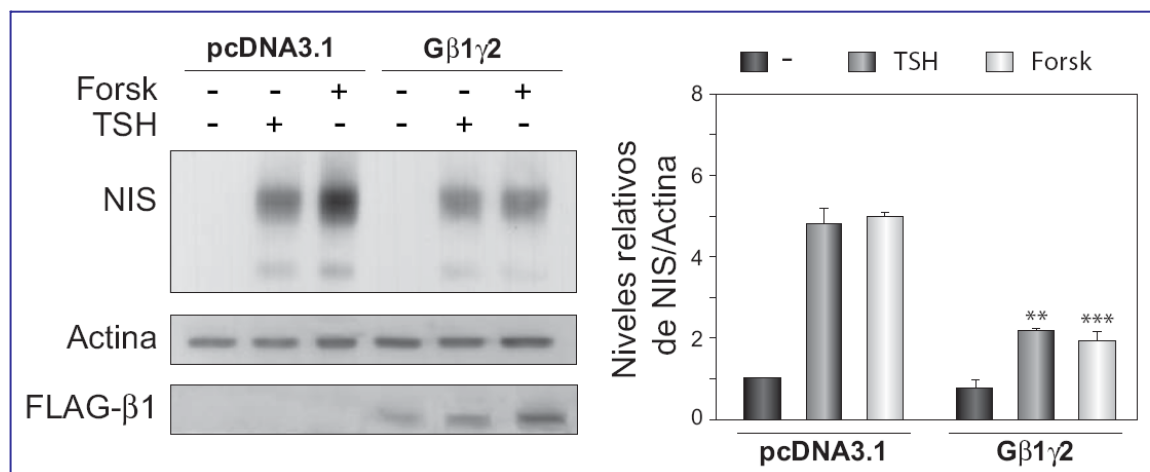


Fig. 14. Regulación de los niveles de NIS por G β 1 γ 2. Se transfectaron células PCCL3 con 10 μ g del vector control pcDNA3.1 ó 5 μ g de los vectores de expresión de FLAG- β 1 y HA- γ 2. Tras la transfección, las células fueron cultivadas durante 5 días en medio 4H y posteriormente se mantuvieron en estas condiciones (-) o se trataron con TSH o forskolina (Forsk) durante 24h. Transcurrido este tiempo las células fueron recogidas para el análisis de los niveles de NIS mediante Western-blot. Se detectaron los niveles de FLAG- β 1 para controlar la eficiencia de la transfección y los de actina como control de carga. El panel de la izquierda muestra un Western-blot representativo y el gráfico a su derecha representa la cuantificación de los niveles de NIS normalizados con respecto a los del control de carga. Los niveles relativos de NIS se expresan como las veces de inducción con respecto a los niveles (=1) de células transfectadas con el vector control y sin tratamiento (-). Los valores representan la media \pm S.D. de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a células transfectadas con el vector control y bajo el mismo tratamiento se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (**): $p = 0,01$ a $0,001$; (***): $p < 0,001$.

Estos resultados indican que la señalización desencadenada por los dímeros G β 1 γ 2 se opone a la inducción de la actividad del promotor de *NIS* en respuesta a TSH o forskolina, lo que se refleja en una reducción de los niveles de proteína.

Se ha descrito que el cultivo continuado de células tiroideas en un medio privado de TSH puede aumentar el nivel de apoptosis celular (Li, 1999). Debido a la elevada vida media de NIS, de aproximadamente 5 días (Riedel, 2001), es necesario mantener a las células en ausencia de TSH durante al menos ese tiempo para lograr una reducción adecuada de la proteína. Para descartar que los resultados obtenidos en los ensayos previos fueran debidos a variaciones en el grado de apoptosis celular, se realizó un ensayo de citometría de flujo con células cultivadas en medio 4H durante períodos de tiempo crecientes. El cultivo de células PCCL3 en ausencia de TSH desde 2 a 6 días, no produjo un aumento destacable en el porcentaje de células apoptóticas (% de células en fase SubG1), con respecto al de células cultivadas en presencia de TSH (Control) (Fig. 15).

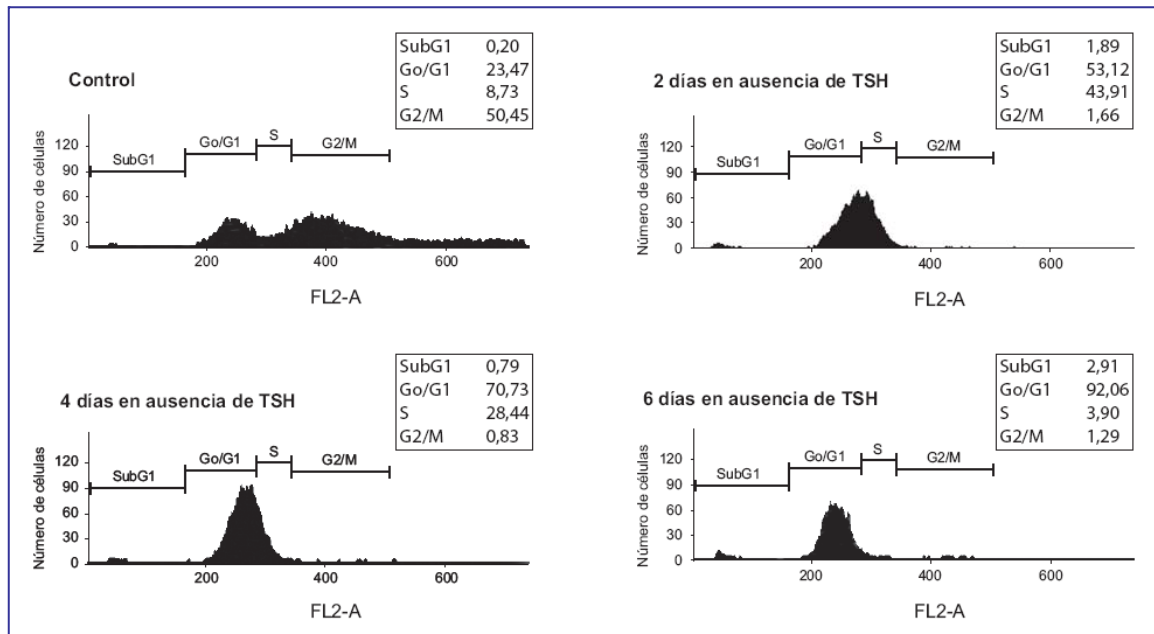


Fig. 15. Análisis de citometría de flujo de células PCC13 cultivadas en ausencia de TSH. Se cultivaron células PCC13 durante 3 días en medio 6H como población celular control que presentaba un patrón de ciclo celular estándar (Control). Alternativamente las células fueron cultivadas en medio 4H durante 2, 4 ó 6 días. A continuación se evaluó la cantidad de DNA presente en las células mediante su tinción con yoduro de propidio, y se analizaron un mínimo de 10.000 células por muestra para la determinación de su distribución en el ciclo celular mediante citometría de flujo. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. Las tablas de datos representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

1.2 La inhibición de la señal $G\beta\gamma$ endógena aumenta la expresión de *NIS* inducida por TSH

A continuación se estudió si los dímeros $G\beta\gamma$ liberados endógenamente tras la unión de la TSH a su receptor afectaban a la expresión de *NIS*, del mismo modo que el dímero $G\beta 1\gamma 2$ expresado exógenamente. Dado que carecíamos de información sobre las isoformas de $G\beta$ y $G\gamma$ que se expresan en células tiroideas, o sobre las combinaciones de estas isoformas liberadas específicamente tras la activación del receptor de TSH, se utilizaron dos mecanismos con capacidad de bloquear la señalización de $G\beta\gamma$ independientemente de las isoformas que conformen estos complejos heterodiméricos (Chuang, 1997). Para ello se emplearon los vectores de expresión de las proteínas CD8- β ARK y pCISG α T-1 (G α T). CD8- β ARK es una molécula quimérica formada por el dominio C-terminal de la quinasa del receptor β adrenérgico-1 (β ARK1), que incluye la región de unión de alta afinidad a dímeros $G\beta\gamma$ y por tanto actúa como un inhibidor competitivo de la señal $G\beta\gamma$ (Koch, 1994), fusionada con los dominios extracelular y transmembrana de la proteína CD8 para dirigir su localización a membrana. G α T es un vector de expresión de la subunidad α de la transducina, con capacidad de unirse a complejos $G\beta\gamma$ y que por tanto también actuaría como un inhibidor competi-

vo de la señal $G\beta\gamma$. Ambas proteínas han sido utilizadas en numerosos estudios y se ha demostrado que son herramientas eficaces para distinguir entre la señalización mediada por subunidades $G\alpha$ y por complejos $G\beta\gamma$ (Avidor-Reiss, 1996; Crespo, 1995; Federman, 1992; Olianias, 1999; Selbie, 1997; Yoshimura, 1996). El secuestro de los complejos $G\beta\gamma$ liberados por la acción de la TSH, mediante la expresión de CD8- β ARK en células PCC13, produjo un aumento significativo y dependiente de dosis en la actividad del promotor de *NIS* inducida por TSH. Este efecto no fue observado cuando las células se estimularon con forskolina, como era de esperar, puesto que la forskolina actúa directamente a la AC y por lo tanto no promueve la liberación de complejos $G\beta\gamma$ (Fig. 16A).

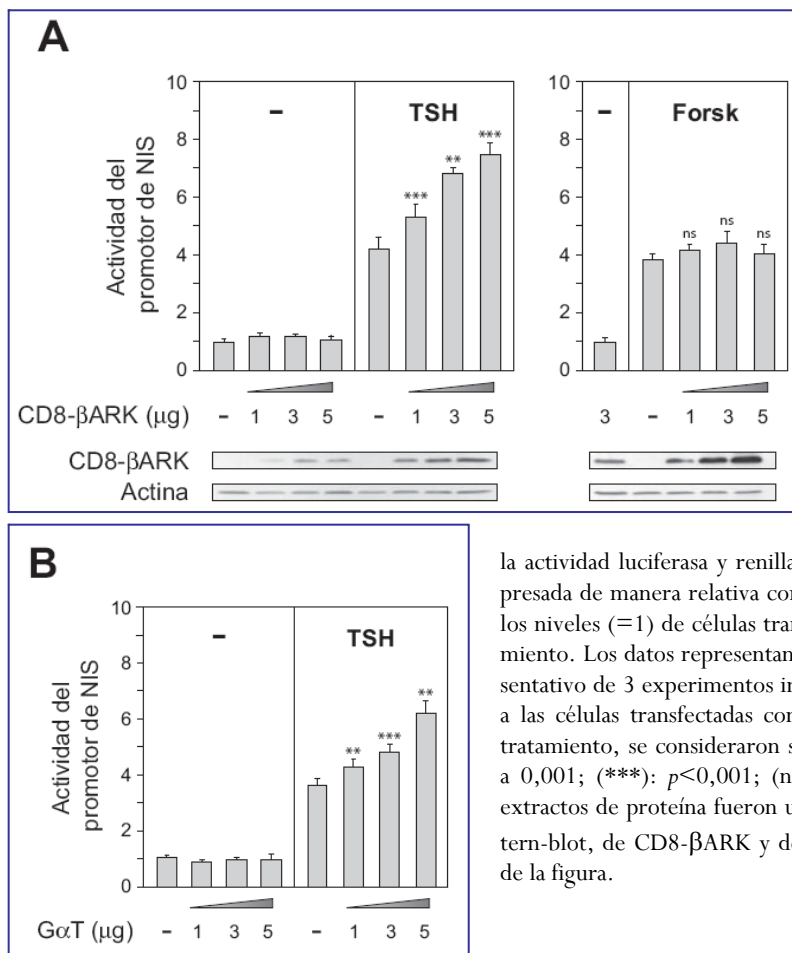


Fig. 16. Efecto de la inhibición de la señal $G\beta\gamma$ endógena sobre la actividad del promotor de *NIS* inducida por TSH o forskolina.

Se transfectaron células PCC13 con 5 μ g de pNIS-2.8, 0,5 μ g de pRL-TK y 1, 3, ó 5 μ g de CD8- β ARK (A) o pCIS-G α T (B). Como vector control se utilizó CD8 (A) ó pcDNA3.1 (B) respectivamente. Tras la transfección, las células fueron cultivadas durante 48h en medio 4H, y transcurrido este período se mantuvieron en estas condiciones (-) o se trataron con TSH (A y B) o forskolina (Forsk) (A) durante 24h. A continuación las células se recolectaron para la determinación de

la actividad luciferasa y renilla. La actividad del promotor de *NIS* es expresada de manera relativa como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el vector control y sin tratamiento. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a las células transfectadas con el vector control CD8 y bajo el mismo tratamiento, se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (**): $p = 0,01$ a 0,001; (***) : $p < 0,001$; (ns: no significativas): $p > 0,05$. Los mismos extractos de proteína fueron utilizados para la detección, mediante Western-blot, de CD8- β ARK y de actina, y se muestran en la parte inferior de la figura.

La expresión de G α T para inhibir la señal $G\beta\gamma$ endógena provocó un efecto similar al observado cuando se expresó CD8- β ARK, detectándose aumentos significativos y dependientes de dosis en la actividad del promotor de *NIS* en respuesta a TSH (Fig. 16B).

Seguidamente se analizó si la interrupción de la señal $G\beta\gamma$, también promovía aumentos en los niveles de proteína inducidos por TSH. Para ello se realizó un ensayo de Western-blot con extractos de proteínas de células PCC13 transfectadas con CD8- β ARK o con el vector de expresión de CD8 como control. Tras 5 días en medio 4H las células fueron tratadas con TSH o forskolina durante

24h. La interrupción de la señal $G\beta\gamma$ provocó un aumento significativo en la inducción de los niveles de NIS en respuesta a TSH, pero no en respuesta a forskolina (Fig. 17).

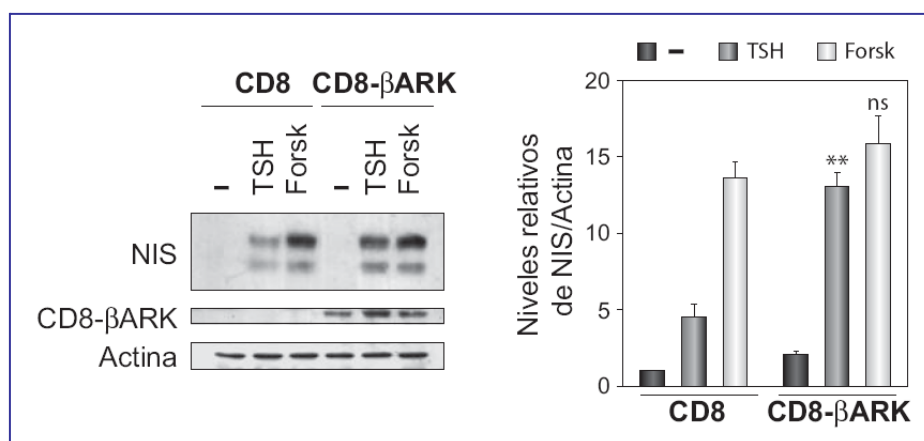


Fig. 17. Efecto de la inhibición de la señal $G\beta\gamma$ endógena sobre el aumento de los niveles de NIS inducido por TSH. Se transfectaron células PCC13 con $5\mu\text{g}$ del vector control CD8 ó $5\mu\text{g}$ del vector de expresión de CD8- β ARK. Tras la transfección, las células fueron cultivadas durante 5 días en medio 4H y posteriormente se mantuvieron en estas condiciones (-) o fueron tratadas con TSH o forskolina durante 24h. Transcurrido este tiempo las células fueron recolectadas y lisadas para la detección de NIS mediante Western-blot. Se muestran los niveles de CD8- β ARK como control de la eficiencia de la transfección y los de actina como control de carga. El panel de la izquierda muestra un Western-blot representativo y el gráfico a su derecha es la cuantificación de los niveles de NIS normalizados con respecto a los del control de carga. Los niveles relativos de NIS se expresan como las veces de inducción con respecto a los niveles (=1) de células sin tratamiento (-). Los valores representan la media \pm S.D. de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a las células transfectadas con el vector control y bajo el mismo tratamiento se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (**): $p = 0,01$ a $0,001$; (ns: no significativas): $p > 0,05$.

Este conjunto de datos indica que los dímeros $G\beta\gamma$ liberados endógenamente tras la activación del TSHR, reducen la actividad del promotor de NIS, provocando finalmente la disminución de la acumulación de proteína promovida por la acción de la TSH.

1.3 Los complejos $G\beta\gamma$ responsables de la reducción de la expresión de NIS son liberados tras la activación de proteínas Gs

Se ha descrito que el TSHR es capaz de asociarse a miembros de todas las familias de proteínas G (Laugwitz, 1996), sin embargo la funcionalidad de la unión de estas distintas familias al TSHR aún no está clara, y varía según la especie estudiada. Nuestro siguiente objetivo fue la identificación de las familias de proteínas G, cuya activación promueve la liberación de los complejos $G\beta\gamma$ implicados en la disminución de la expresión de NIS observada en nuestros ensayos previos.

Aunque la mayoría de las acciones de la TSH sobre la célula tiroidea son llevadas a cabo a través de la activación de la vía $G\alpha s/cAMP$ (Dumont, 1971), se ha descrito que en células tiroideas de rata, el TSHR es capaz de acoplarse a la subfamilia $Gq/G11$ en presencia de concentraciones de TSH que superan de 100 a 1000 veces los niveles fisiológicos (Field, 1987). Dado que en nuestros ensayos se utilizó una concentración 1nM de TSH, que se encuentra dentro del rango fisiológico,

este grupo de proteínas G fue descartado como el responsable de la liberación de complejos $G\beta\gamma$ en nuestros experimentos previos.

Otro posible candidato con capacidad de acoplarse al TSHR sería la subfamilia G_i . Se ha descrito que el tratamiento previo con PTX (Toxina pertúsica) de secciones de tiroides humano aumenta la acumulación de cAMP en respuesta a TSH (Laugwitz, 1996). Si la disminución de la expresión de NIS observada anteriormente es provocada por la liberación de complejos $G\beta\gamma$ provenientes de proteínas G_i , el bloqueo de la unión de G_i al TSHR mediante el uso de PTX reproduciría los aumentos en la actividad del promotor observados cuando la señal $G\beta\gamma$ fue bloqueada. Los resultados obtenidos indican que el aumento en la actividad del promotor de *NIS* inducido por TSH, no fue potenciado por el pretratamiento con PTX, lo que nos permitió descartar el acoplamiento de proteínas G_i al TSHR a las concentraciones fisiológicas de hormona utilizadas en nuestros estudios (Fig. 18).

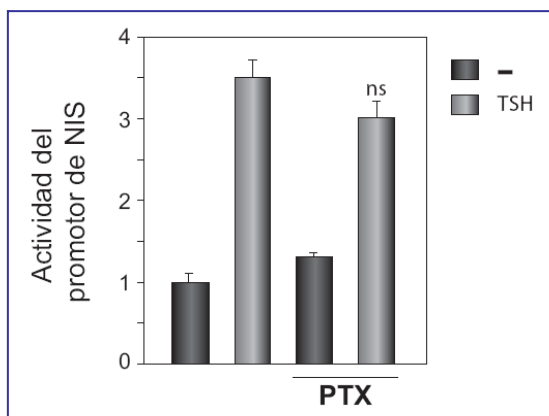


Fig. 18. Efecto de PTX sobre la inducción de la actividad del promotor de *NIS* en respuesta a TSH. Se transfectaron células PCC13 con $3\mu\text{g}$ del promotor de *NIS* (pNIS2.8) y $0,5\mu\text{g}$ del vector pRL-TK. Tras la transfección las células se cultivaron durante 2 días en medio 4H. Transcurrido este tiempo las células fueron tratadas durante 24h con toxina pertúsica (PTX) donde se indica, tras lo que se mantuvieron en estas condiciones (-) o se estimularon con TSH durante 24h. La actividad del promotor de *NIS* es expresada como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células en ausencia de PTX y TSH. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a las células tratadas con TSH y en ausencia de PTX

se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (ns: no significativas): $p > 0,05$.

Finalmente, para confirmar que los dímeros $G\beta\gamma$ liberados en respuesta a TSH provenían de la activación de proteínas G_s , que median mayoritariamente los efectos de la hormona sobre la célula tiroidea, se estimularon células PCC13 con CTX (Toxina colérica) para inducir la activación constitutiva de subunidades $G\alpha_s$ y la liberación constante de los dímeros $G\beta\gamma$ asociados a estos complejos. El tratamiento con CTX provocó un aumento en la actividad del promotor de *NIS* similar al inducido por el tratamiento con TSH. Al igual que sucedía en células estimuladas con TSH, el efecto de CTX sobre la actividad del promotor de *NIS*, fue potenciado de manera significativa por la interrupción de la señal $G\beta\gamma$ (Fig. 19).

Esta serie de ensayos nos permitió concluir que los dímeros $G\beta\gamma$ liberados tras la unión de la TSH a su receptor provienen de la activación de la subfamilia G_s de proteínas G, siendo nulo el aporte de otras subfamilias de estas proteínas en las condiciones experimentales utilizadas en nuestro estudio.

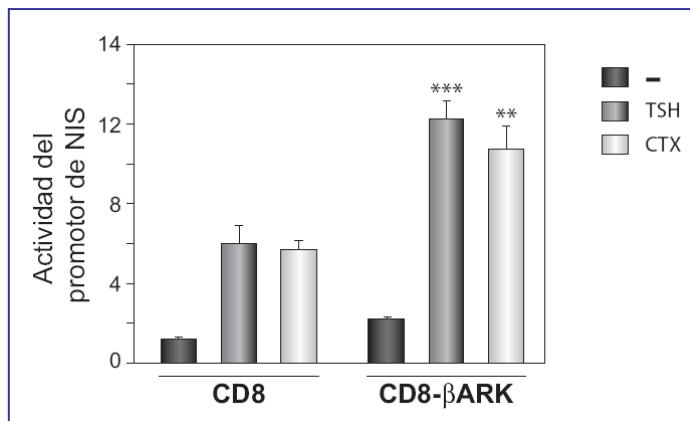


Fig. 19. Efecto de CTX sobre la actividad del promotor de *NIS*.

Se transfirieron células PCC13 con 3 μ g del promotor de *NIS* (pNIS2.8), 0,5 μ g de pRL-TK y 5 μ g de CD8- β ARK o del vector control CD8. Tras la transfección las células fueron cultivadas durante 2 días en medio 4H y posteriormente se mantuvieron en estas condiciones (-) o se trataron durante 24h con TSH o toxina colérica (CTX). La actividad del promotor de *NIS* es expresada como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el vector control y en ausencia de CTX o TSH. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de

un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a las células transfectadas con el vector control y bajo el mismo tratamiento se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (**): $p = 0,01$ a $0,001$; (***): $p < 0,001$.

1.4 La inhibición de la señal G $\beta\gamma$ endógena no aumenta la expresión de tiroglobulina (Tg) en respuesta a TSH

Para determinar si el efecto de G $\beta\gamma$ sobre la expresión de *NIS* era específico de promotor, se estudió la posibilidad de que la señalización promovida por G $\beta\gamma$ afectara también a la expresión de otros genes marcadores de la diferenciación tiroidea, como es el caso de la *Tg*. Para ello se analizó la expresión del gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de *Tg* humano, en células PCC13 que expresaban CD8- β ARK o CD8 como control. El bloqueo de la señal G $\beta\gamma$, no potenció el aumento de la actividad del promotor de *Tg* promovido por la TSH (Fig. 20A), en contraste con el aumento observado en las mismas condiciones sobre la actividad del promotor de *NIS*. De acuerdo con este resultado el aumento de los niveles de Tg, inducido por TSH o forskolina, no fue significativamente afectado por la interrupción de la señal G $\beta\gamma$ (Fig. 20B).

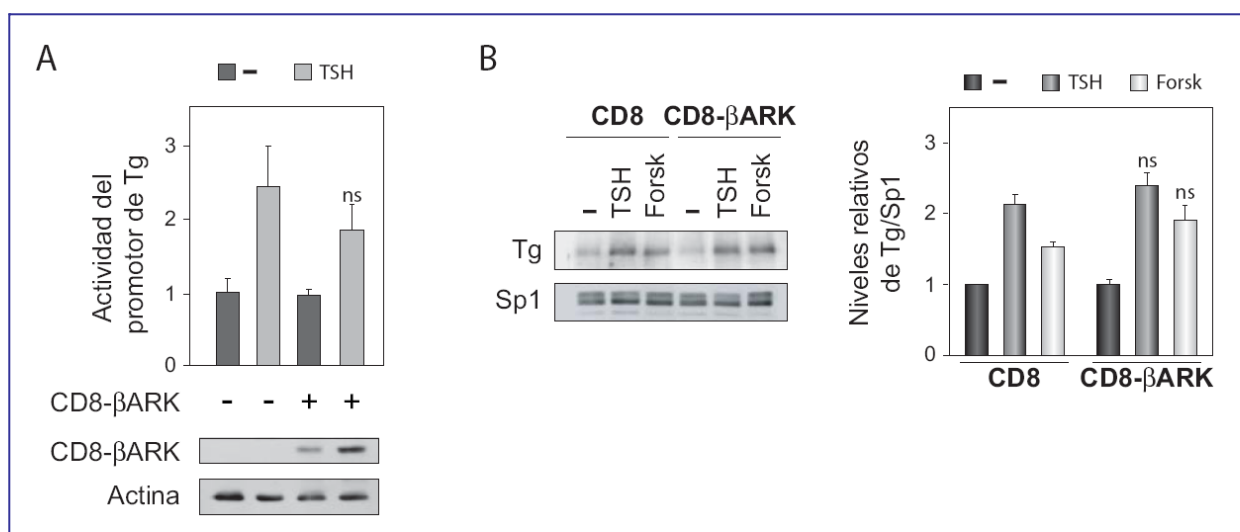


Fig. 20. Efecto de la inhibición de la señal Gβγ endógena sobre la expresión de Tg inducida por TSH. Se transfectaron células PCC13 con 3μg de hTGenh/prm-Luc, 0,5μg de pRL-TK (Panel A) y 5μg de CD8-βARK o de CD8 como vector control. Tras la transfección, las células fueron cultivadas durante 48h (Panel A) o 5 días (Panel B) en medio 4H y transcurrido este período se mantuvieron en estas condiciones (-) o se trataron con TSH o forskolina (Panel B) durante 24h. **Panel A:** La actividad del promotor de *Tg* es expresada como el número de veces de activación sobre los niveles (=1) de células transfectadas con CD8 y sin tratamiento. Los datos representan la media±S.D. (n=3) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a las células transfectadas con el vector control y bajo el mismo tratamiento, se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (ns: no significativas): $p > 0,05$. Los mismos extractos de proteínas fueron utilizados para la detección mediante Western-blot, de CD8-βARK y actina, y se muestran en la parte inferior de la figura. **Panel B:** Tras el tratamiento, se determinaron mediante Western-blot los niveles de Tg y de Sp1 como control de carga. El panel de la izquierda muestra un Western-blot representativo y el gráfico a su derecha representa la cuantificación de los niveles de Tg normalizados con respecto a los del control de carga. Los niveles relativos de Tg se expresan como las veces de inducción con respecto los niveles (=1) de células transfectadas con el vector control y sin tratamiento (-). Los valores representan la media±S.D. de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a células transfectadas con el vector control y bajo el mismo tratamiento se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (ns: no significativas): $p > 0,05$.

Por lo tanto, podemos concluir que los dímeros Gβγ liberados tras la activación del TSHR en respuesta a TSH, desencadenan señales que regulan de manera diferencial la expresión de los genes de diferenciación tiroideos, inhibiendo la expresión de *NIS* pero no la de *Tg*.

1.5 Los complejos Gβγ no alteran los niveles intracelulares de cAMP

La familia de la AC fue descrita como una de las primeras dianas de la actividad de los dímeros Gβγ (Sunahara, 1996). Estos pueden inhibir o activar a la AC, dependiendo tanto de las combinaciones de Gβγ formadas, como de la isoforma de AC sobre la que actúen. Por tanto el efecto observado sobre la expresión de *NIS* en los experimentos anteriores, podría ser debido a variaciones en los niveles de cAMP provocadas por la acción de los complejos Gβγ sobre la AC. Para aclarar este punto, se transfectaron células PCC13 con los vectores de expresión de FLAG-β1 y HA-γ2, CD8-βARK o pcDNA3.1 como vector control. Después de 2 días en medio 4H, las células fueron pretratadas con el inhibidor de fosfodiesterasas IBMX (3-isobutil-1-metil-xantina), para impedir la degradación del cAMP acumulado, y posteriormente estimuladas con TSH durante 1h. Transcurrido este tiempo, las células fueron recogidas para evaluar los niveles intracelulares de cAMP. Como ha sido descrito (Dumont, 1971), el tratamiento con TSH indujo un aumento en la concentración del cAMP intracelular, que no fue afectado por la expresión de Gβ1γ2 o por la interrupción de la señal Gβγ (Fig. 21A).

Debido a que con este método no resulta posible controlar la eficiencia de la transfección, estos resultados fueron corroborados mediante otra aproximación experimental. Para ello se transfectaron células PCC13 con un vector de expresión del gen reportero de la luciferasa bajo el control de una secuencia formada por 3 elementos de respuesta a cAMP (CRE) dispuestos en tándem, junto

con el vector pRL-TK y los vectores de expresión de las proteínas FLAG- β 1 y HA- γ 2, CD8- β ARK, o pcDNA3.1 como vector control. Tras 2 días en medio 4H, las células fueron tratadas con TSH durante 24h y recolectadas para el análisis de la actividad luciferasa y renilla. Ni la expresión ni el secuestro de complejos G $\beta\gamma$, produjeron variaciones significativas en la inducción de la actividad de una construcción controlada por cAMP (Fig. 21B).

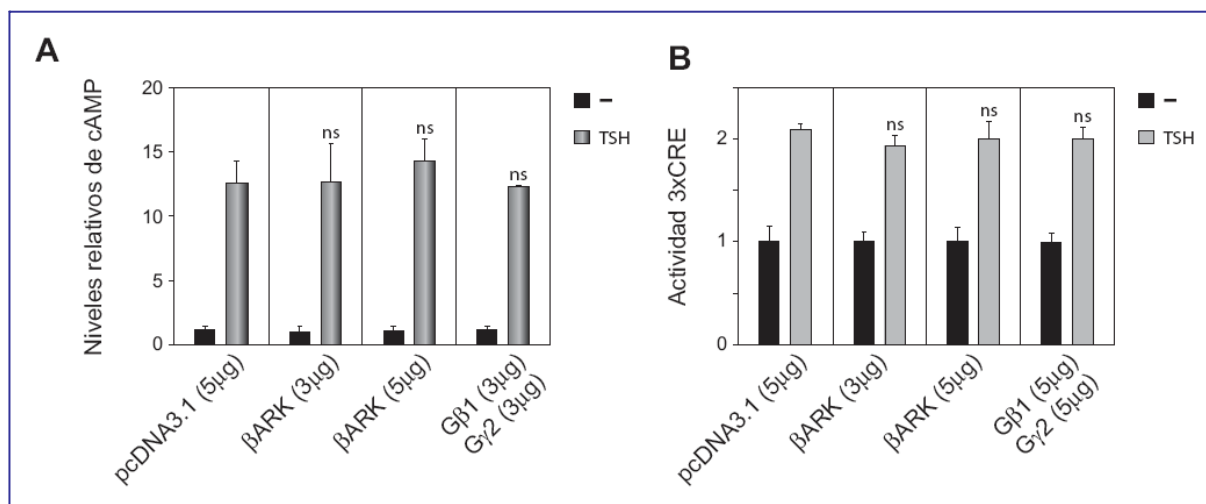


Fig. 21. Efecto de G $\beta\gamma$ sobre la inducción de los niveles de cAMP en respuesta a TSH. Se transfectoron células PCC13 con 5 μ g del vector reportero 3XCRE-LUC y 0,5 μ g del vector pRL-TK (Panel B), 3 ó 5 μ g de CD8- β ARK, 3 ó 5 μ g de FLAG- β 1 y HA- γ 2, o con pcDNA3.1 como vector control. Tras la transfección las células se mantuvieron durante 2 días en medio 4H y posteriormente fueron tratadas durante 30min con IBMX 0,5mM y mantenidas en el mismo medio (-) o tratadas con TSH durante 1h (Panel A) ó 24h (Panel B). **Panel A:** A continuación las células fueron recolectadas para la determinación de los niveles intracelulares de cAMP. El grado de inducción de cAMP en respuesta a TSH se muestra como las veces de inducción sobre los niveles (=1) de células cultivadas en ausencia de TSH (-). Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias entre el grado de inducción de los niveles de cAMP con respecto a las células tratadas con TSH y transfectadas con el vector control se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (ns: no significativas): $p > 0,05$. **Panel B:** La actividad luciferasa relativa representa el valor de unidades de luz normalizado con respecto a la actividad renilla derivada del vector pRL-TK. La actividad 3XCRE-LUC se expresa como las veces de inducción de los niveles (=1) de células en ausencia de TSH (-). Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a células transfectadas con el vector control y tratadas con TSH se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (ns: no significativas): $p > 0,05$.

Estos datos indican que los efectos de los complejos G $\beta\gamma$ sobre la expresión de NIS no son debidos a variaciones en los niveles de cAMP, que podrían ser consecuencia de la acción de G $\beta\gamma$ sobre la actividad de la AC, o de los efectos que el exceso o defecto de G $\beta\gamma$ pudiera tener sobre la actividad de las subunidades G α s.

1.6 La TSH promueve la activación de la vía de la PI3K

La PI3K se ha descrito como uno de los principales efectores de la señalización a través de dímeros G $\beta\gamma$ iniciada por GPCRs (Krugmann, 1999). Dado que en un estudio previo de nuestro laboratorio se describió que la activación de la vía de la PI3K, mediante la estimulación con el factor de

crecimiento IGF-1, disminuía la expresión de NIS inducida por TSH (García, 2002), se decidió estudiar si la PI3K era un efector de las subunidades $G\beta\gamma$ en células tiroideas y si esta activación estaba implicada en la inhibición de la expresión de NIS observada en los ensayos previos.

Para ello se analizó la activación de la vía de la PI3K en respuesta a TSH, forskolina e IGF-1 en células PCCl3. Como indicador de la activación de esta vía se analizaron los niveles de Akt fosforilada en el residuo de Ser473, que es específicamente fosforilado tras la activación de la vía de la PI3K. La TSH inducía la acumulación de p-Akt de manera dependiente de tiempo, con una estimulación máxima entre 30min y 1h. La forskolina también aumentó los niveles de p-Akt aunque en menor medida que la TSH. Como control positivo se muestran los niveles de p-Akt tras el tratamiento con IGF-1 (Fig. 22).

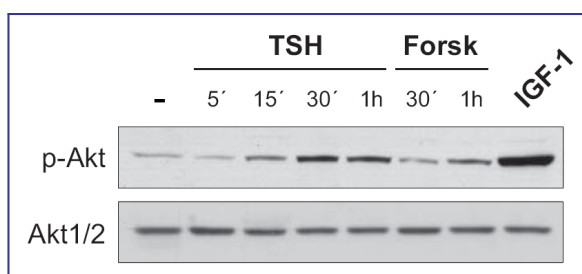


Fig. 22. Aumento de los niveles de p-Akt en respuesta a TSH, forskolina e IGF-1. Se cultivaron células PCCl3 en medio 4H durante 2 días y a continuación se mantuvieron en este medio (-) o se trataron con TSH durante 5, 15, 30 ó 60min, con forskolina (Forsk) durante 30 ó 60min o con IGF-1 durante 15min como control positivo. Tras el tratamiento, las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de los niveles de p-Akt y de Akt 1/2 como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

El aumento de los niveles de p-Akt mediante el tratamiento con TSH o forskolina, tanto a tiempos cortos (30min) como a tiempos largos (24h), fue bloqueado mediante el tratamiento previo con LY294002 (LY), un inhibidor de la PI3K, demostrando que la fosforilación de Akt inducida por TSH o forskolina estaba mediada por la activación de esta vía (Fig. 23).

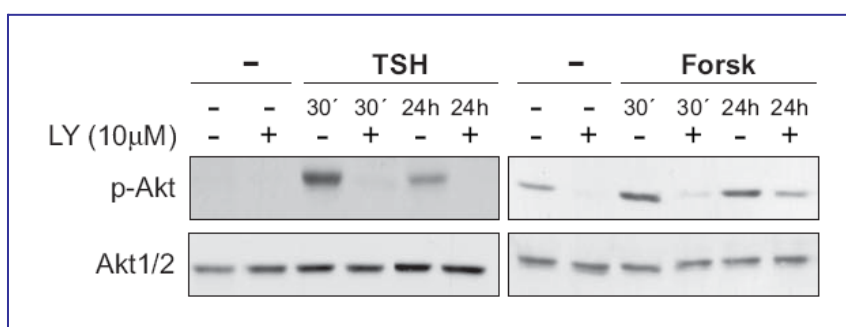


Fig. 23. Efecto de la inhibición de PI3K sobre los niveles de p-Akt en respuesta a TSH y forskolina. Se cultivaron células PCCl3 en medio 4H durante 48h y posteriormente se mantuvieron en este medio (-) o se trataron con LY294002 (LY) durante 1h (+). A continuación las células fueron estimuladas durante 30min ó 24h con TSH o

forskolina (Forsk). Tras el tratamiento las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de los niveles de p-Akt y de Akt1/2 como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

La activación de la vía de la PI3K en respuesta a TSH es un tema muy discutido y dependiendo de la especie estudiada se han encontrado diferencias en la capacidad y grado de activación de esta ruta de señalización (Kimura, 2001). Diversos autores han descrito la activación de la vía de la PI3K

por TSH en células de rata (Cass, 2000), mientras que otros autores han sugerido que esta activación es debida a la contaminación con factores de crecimiento de la preparación de TSH bovina, procedente de extractos hipofisarios (que ha sido utilizada en los ensayos previos de este trabajo). Para descartar esta posibilidad se realizó un ensayo para detectar la inducción de los niveles de p-Akt en respuesta a una TSH humana recombinante (hrTSH), libre de posibles contaminaciones. En primer lugar, se evaluó la capacidad de la hrTSH de activar al promotor de *NIS*. Esta apenas variaba en respuesta a concentraciones de hrTSH que oscilaban entre 0,1 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y no difería en gran medida a la observada en células tratadas con la TSH bovina (Fig. 24A). A continuación se procedió a evaluar la capacidad de la hrTSH de activar la vía de la PI3K, mediante la detección por Western-blot de los niveles de p-Akt. El tratamiento de células PCCL3 con hrTSH también indujo aumentos en los niveles de p-Akt, indicando que la activación de esta vía de señalización en respuesta a TSH no es debida a la presencia de factores contaminantes en la muestra (Fig. 24B).

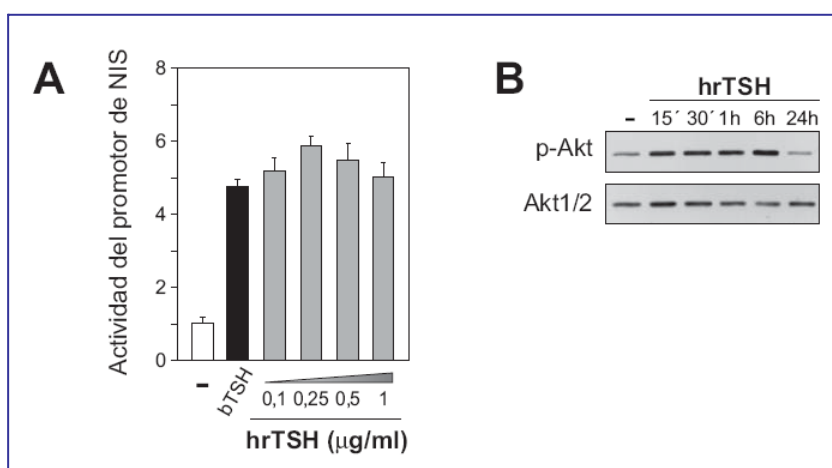


Fig. 24. Panel A: Activación del promotor de *NIS* en respuesta a hrTSH. Se transfectaron células PCCL3 con 3 μg del promotor de *NIS* y 0,5 μg de pRL-TK para controlar la eficiencia de la transfección. Tras 2 días en medio 4H las células se mantuvieron en dicho medio (-) o se trataron con TSH bovina (bTSH) 1nM o TSH humana recombinante (hrTSH) a las concentraciones que se indican. La actividad del promotor de *NIS* se expresó como el número de veces de inducción sobre los niveles (=1) de células cultivadas en ausencia de TSH (-). Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. **Panel B: Efecto de la hrTSH sobre los niveles de p-Akt.** Se cultivaron células PCCL3 en medio 4H durante 2 días y a continuación se mantuvieron en este medio (-) o se trataron con hrTSH durante los tiempos que se indican. Tras el tratamiento las células fueron recolectadas para la detección mediante análisis de Western-blot de los niveles de p-Akt y de Akt1/2 como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

El aumento en los niveles de p-Akt fue bloqueado de manera dependiente de dosis mediante el tratamiento previo con LY294002 (LY). Este resultado fue confirmado mediante el uso de Wortmanina (Wort), otro inhibidor de la PI3K, demostrando que la inducción de la fosforilación de Akt por la hrTSH estaba mediada por la activación de la vía de la PI3K (Fig. 25).

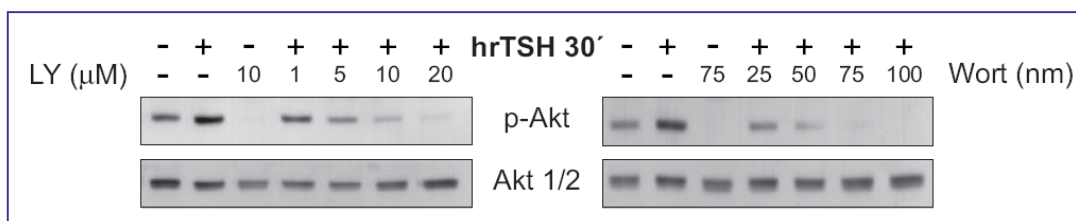


Fig. 25. Efecto de la inhibición de PI3K sobre el aumento de los niveles de p-Akt en respuesta a hrTSH. Se cultivaron células PCCL3 en medio 4H durante 2 días y posteriormente se trataron durante 1h con el inhibidor LY294002 (LY) (panel de la izquierda) o con Wortmanina (Wort) (panel de la derecha) a las concentraciones que se indican. A continuación las células se mantuvieron en el mismo medio (-) o se trataron durante 30min con hrTSH (+), tras lo que fueron recogidas para la detección mediante Western-blot de los niveles de p-Akt y de Akt1/2 como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

1.7 La activación de la PI3K inducida por TSH no está mediada por cAMP

El cAMP, vía PKA, es el mediador principal de los efectos de la TSH sobre la célula tiroidea, y ha sido implicado tanto en su diferenciación como en su proliferación, por tanto se procedió a analizar el posible papel de esta vía de señalización en la activación de la PI3K. Para ello se cultivaron células PCCL3 con TSH o forskolina en presencia del H89, un inhibidor de la PKA. De nuevo, como indicador de la activación de la vía de la PI3K se detectaron los niveles de p-Akt. El tratamiento con H89 aumentó los niveles basales de p-Akt como se ha descrito (Kato, 2007) y no bloqueó significativamente el aumento en los niveles de p-Akt inducido por TSH o forskolina (Fig. 26).

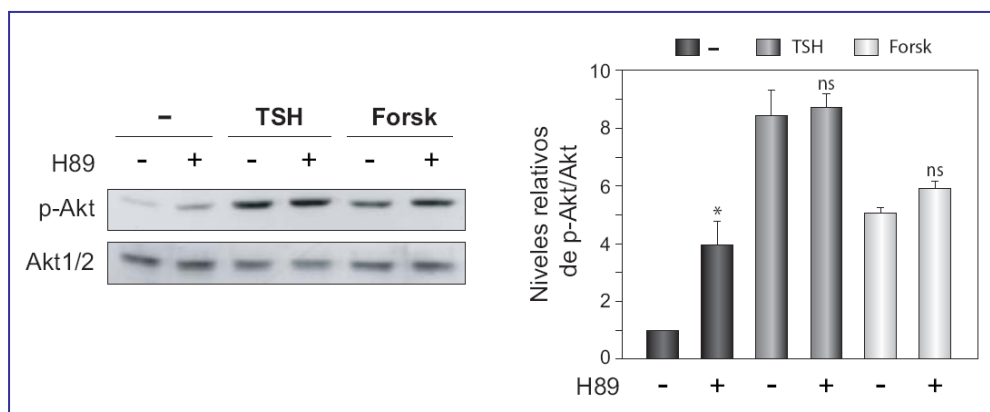


Fig. 26. Efecto de la inhibición de PKA sobre los niveles de p-Akt inducidos por TSH o forskolina. Se cultivaron células PCCL3 en medio 4H durante 3 días y a continuación se trataron con H89 a una concentración final de 10μM (+) durante 1h, seguido de la estimulación con TSH o forskolina (Forsk) durante 30min. Tras el tratamiento las células fueron recolectadas para la detección, mediante Western-blot, de los niveles de p-Akt y de Akt1/2 como control de carga. El panel de la izquierda muestra un Western-blot representativo y el gráfico a su derecha representa la cuantificación de los niveles de p-Akt normalizados con respecto a los del control de carga. Los niveles relativos de p-Akt se expresan como las veces de inducción con respecto a los niveles (=1) de células sin tratamiento (-) y en ausencia de H89 (-). Los valores representan la media±S.D. de 3 experimentos independientes. Las diferencias con respecto a los niveles de células en ausencia de H89 (-) y bajo el mismo tratamiento se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (*): $p < 0,05$; (ns: no significativas): $p > 0,05$.

Sin embargo, la PKA no es el único efector del cAMP en células tiroideas, y se ha descrito que es capaz de activar a proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina activadas por cAMP (Epacs) que llevarían a la activación de diversas proteínas, incluyendo a Rap1 y Ras, que podrían inducir la activación de la PI3K. Para analizar la posibilidad de que esta u otras vías dependientes de cAMP, al margen de la vía de la PKA, estuvieran mediando la activación de la vía de la PI3K en respuesta a TSH, se usó el compuesto Rp-cAMP, un competidor análogo del cAMP, que fue añadido a las células previamente al tratamiento con TSH. Como indicador de la activación de la PI3K se detectaron los niveles de p-Akt, y para probar la efectividad del competidor del cAMP utilizado se analizaron los niveles de CREB, un efector de PKA que es fosforilado en respuesta a cAMP. El tratamiento previo con Rp-cAMP no impidió la activación de la vía de la PI3K en respuesta a TSH, aunque sí fue capaz de inhibir la fosforilación de CREB, demostrando que la TSH es capaz de promover la activación de la vía de la PI3K de manera independiente de cAMP (Fig. 27).

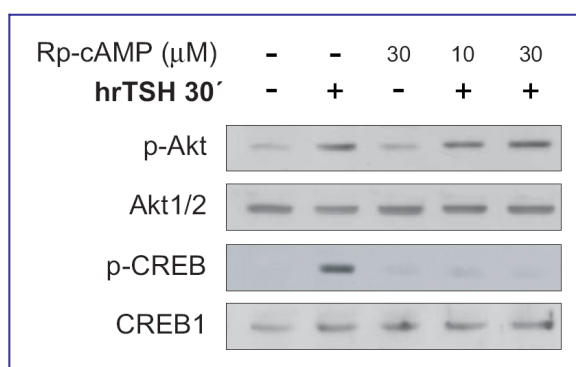


Fig. 27. Efecto de la inhibición de las rutas dependientes de cAMP sobre la inducción de los niveles de p-Akt en respuesta a TSH. Se cultivaron células PCCL3 en medio 4H durante 3 días, y a continuación se trataron con el competidor Rp-cAMP durante 1h a las concentraciones que se indican, seguido del tratamiento con hrTSH durante 30min (+). Posteriormente las células se recogieron para la detección mediante Western-blot de los niveles de p-Akt, p-CREB y Akt1/2 y CREB1 como controles de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

1.8 La liberación de complejos G β γ inducida por TSH promueve la activación de la vía de la PI3K

Los resultados descritos anteriormente indican que la TSH es capaz de activar la ruta de la PI3K de manera independiente de cAMP. Dado que la PI3K ha sido descrita como un posible efector de la acción de los dímeros G β γ , se planteó la posibilidad de que la activación inducida por TSH de esta vía de señalización, estuviera mediada por la liberación de complejos G β γ . Para responder a esta pregunta, se analizó el efecto de expresar o secuestrar complejos G β γ sobre el aumento de los niveles de p-Akt inducido por TSH. La expresión del dímero G β 1 γ 2 en células PCCL3 indujo aumentos en los niveles de p-Akt que fueron potenciados por el tratamiento con TSH (Fig. 28).

Por el contrario, la expresión de CD8- β ARK para bloquear la señalización mediada por G β γ en células PCCL3, suprimía el aumento de los niveles de p-Akt inducido por TSH. El bloqueo de la señal G β γ no tuvo efecto sobre el aumento de los niveles de p-Akt inducido por forskolina (Forsk),

que es un activador directo de la AC, o sobre el aumento inducido por IGF-1, que actúa a través de su receptor con actividad tirosina kinasa (Fig. 29). Ambos estímulos son por lo tanto independientes de proteínas G y promueven la activación de la vía de la PI3K independientemente de G $\beta\gamma$.

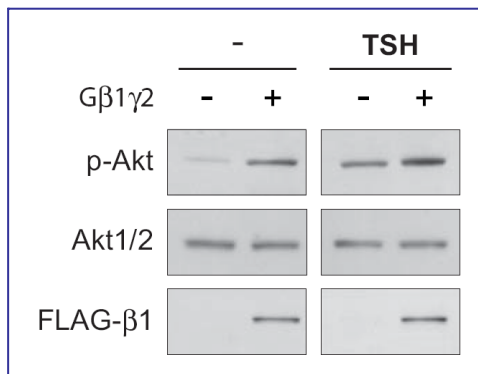


Fig. 28. Efecto de la expresión de G β 1 γ 2 sobre los niveles de p-Akt. Se transfectaron células PCCL3 con 5 μ g de FLAG- β 1 y HA- γ 2 (+) o con 10 μ g de DNA3.1 (-) como control. Las células se cultivaron en medio 4H durante 2 días, tras lo que se mantuvieron en dicho medio (-) o se trataron con TSH durante 30min. Tras el tratamiento las células se recogieron para la detección mediante Western-blot de los niveles de p-Akt, de Akt1/2 como control de carga y de FLAG- β 1 para controlar la eficiencia de la transfección. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

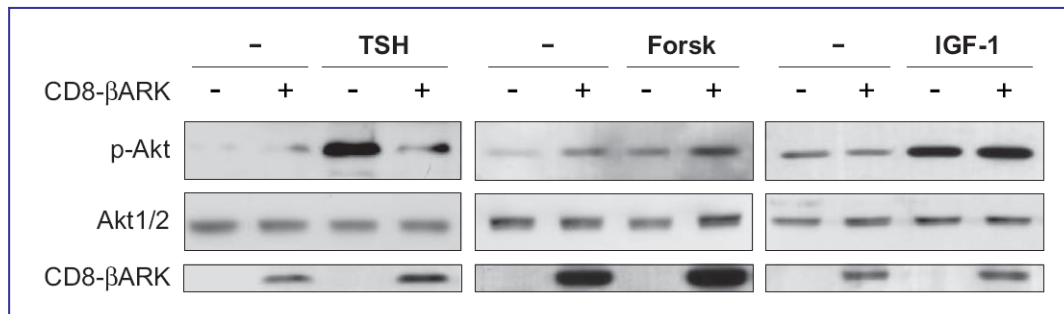


Fig. 29. Efecto del bloqueo de la señal G $\beta\gamma$ sobre el aumento de los niveles de p-Akt inducido por TSH, forskolina o IGF-1. Se transfectaron células PCCL3 con 5 μ g de CD8- β ARK o del vector control CD8. 24h después de la transfección, las células fueron cultivadas en medio 4H durante 48h, a continuación se mantuvieron en este medio (-) o fueron tratadas con TSH (30min), forskolina (30min) o IGF-1 (15min), y posteriormente recogidas para la detección mediante Western-blot de los niveles de p-Akt, de Akt1/2 como control de carga y de CD8- β ARK para controlar la eficiencia de la transfección. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

En conclusión, estos resultados indican que la TSH tras la unión a su receptor, promueve la liberación de complejos G $\beta\gamma$ que activan la vía de la PI3K. Esta ruta de señalización promueve la reducción de la expresión de NIS mediada por la vía de TSH/cAMP.

1.9 La señal mediada por G $\beta\gamma$ promueve la disminución de la capacidad de unión de Pax8 al promotor de *NIS* y aumenta su localización extranuclear

La expresión de *NIS* está controlada en su mayor parte por la acción del factor de transcripción “paired-box” Pax8, que ejerce su control a través de su unión a dos secuencias de nucleótidos (PA y PB) situadas en una región localizada entre los nucleótidos -2264 y -2495 en dirección 5’ del inicio de la transcripción del promotor de *NIS*, en la región denominada NUE (NIS Upstream Enhancer) (Ohno, 1999) (Ver Fig. 2).

Nuestros datos han demostrado que los dímeros $G\beta\gamma$ liberados por la acción de la TSH reprimen la actividad del promotor de *NIS*. Con objeto de profundizar en el mecanismo transcripcional responsable de la reducción de la expresión de *NIS*, se determinó si el secuestro de la señal $G\beta\gamma$ tenía algún efecto sobre los niveles del factor de transcripción Pax8. El tratamiento de células PCC13 con TSH o forskolina, aumentó los niveles de Pax8 como ha sido descrito (Mascia, 2002), sin embargo este incremento no fue alterado de manera significativa por el bloqueo de la señal $G\beta\gamma$ (Fig. 30).

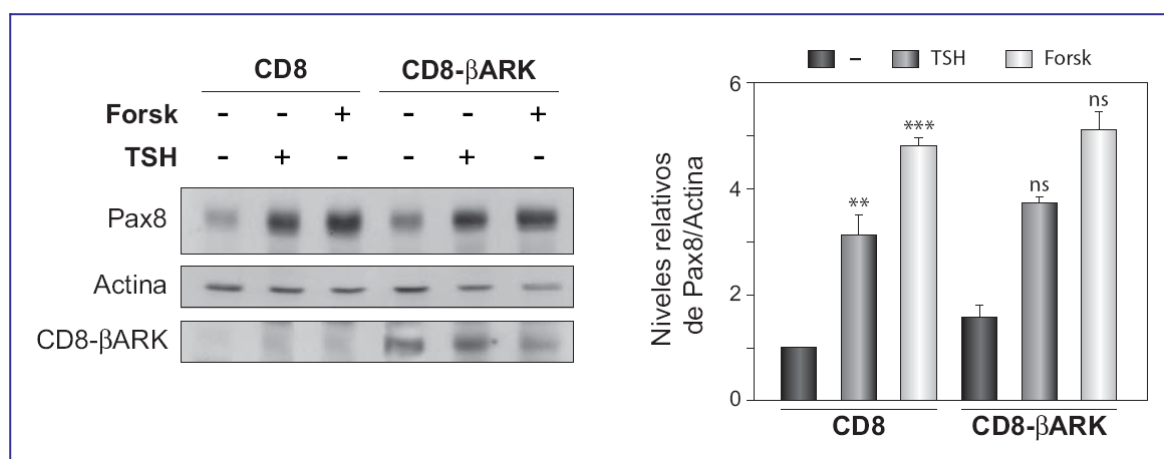


Fig. 30. Regulación de los niveles de Pax8 por los dímeros $G\beta\gamma$ liberados en respuesta a TSH. Se transfectaron células PCC13 con $5\mu\text{g}$ de CD8-βARK o del vector control CD8, y posteriormente se cultivaron en medio 4H durante 3 días. Transcurrido este tiempo las células se mantuvieron en este medio (-) o se trataron con TSH o forskolina (Forsk) durante 24h. A continuación las células fueron recogidas para la determinación mediante Western-blot de los niveles de Pax8, de actina como control de carga y de CD8-βARK para evaluar la eficiencia de la transfección. El panel de la izquierda muestra un Western-blot representativo y el gráfico a su derecha representa la cuantificación de los niveles de Pax8 normalizados con respecto a los del control de carga. Los niveles relativos de Pax8 se expresaron como las veces de inducción con respecto a los niveles (=1) de células transfectadas con el vector control y cultivadas en ausencia de estímulo (-). Los valores representan la media \pm S.D. de 3 experimentos independientes. Las diferencias de las células transfectadas con CD8 y estimuladas con TSH o forskolina con respecto a las células en ausencia de estímulo, así como de las células transfectadas con CD8-βARK con respecto a las transfectadas con CD8 y bajo el mismo tratamiento, se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. (**): $p = 0,01$ a $0,001$; (***): $p < 0,001$; (ns: no significativas): $p > 0,05$.

Aunque la inhibición de la señal $G\beta\gamma$ no modificó significativamente el aumento de los niveles de Pax8 en respuesta a TSH o forskolina, la acción de Pax8 podría estar afectada a otros niveles. A continuación se evaluó si el secuestro de los complejos $G\beta\gamma$ era capaz de modificar la capacidad de unión de Pax8 al promotor de *NIS*, en respuesta a TSH o forskolina. Con este fin, se transfectaron células PCC13 con el vector de expresión de CD8-βARK o con el de CD8 como control. Tras el tratamiento con TSH o forskolina durante 24h, se aislaron los extractos nucleares y se determinó la capacidad de unión de Pax8 al sitio PB del promotor de *NIS*, mediante un ensayo de retardo en gel. En las células transfectadas con CD8 la cantidad de los complejos Pax8/DNA aumentó en respuesta a TSH (Fig. 31, panel superior, comparar carriles 2 y 3) y forskolina (Fig. 31, panel inferior, com-

parar carriles 2 y 3). Cuando los complejos $G\beta\gamma$ fueron secuestrados mediante la expresión de CD8- β ARK, se observó un incremento en la intensidad de los complejos formados en respuesta a TSH (Fig. 31, panel superior, comparar carriles 3 y 8), pero no en respuesta a forskolina (Fig. 31, panel inferior, comparar carriles 3 y 8). La cantidad de Pax8 que se unía a su sitio en el promotor de *NIS* en respuesta a TSH también fue incrementada cuando la actividad PI3K fue inhibida (Fig. 31, panel superior, comparar carriles 3 y 12), pero no se observó ninguna variación en respuesta a forskolina (Fig. 31, panel inferior, comparar carriles 3 y 12).

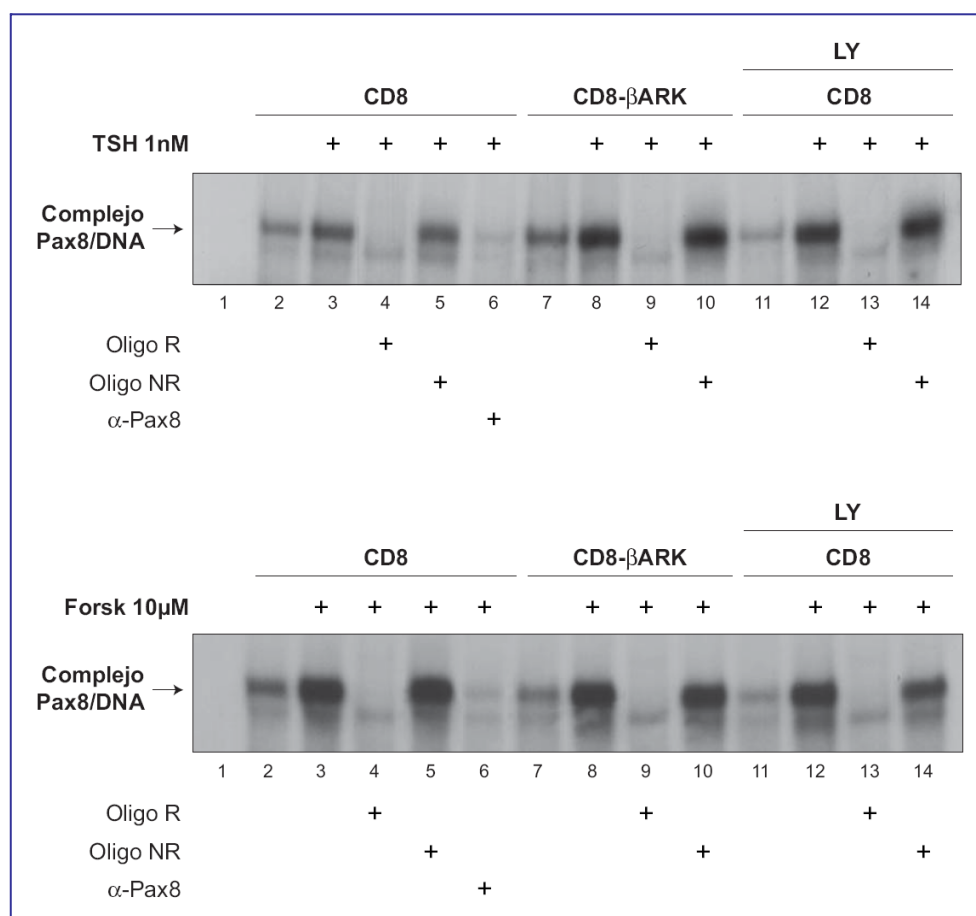


Fig. 31. Efecto de los dímeros $G\beta\gamma$ sobre la unión de Pax8 al promotor de *NIS* inducida por TSH y forskolina. Se transfectaron células PCCL3 con 5 μ g de CD8- β ARK o del vector control CD8. Tras la transfección las células fueron cultivadas en medio 4H durante 3 días y a continuación se mantuvieron en este medio o se trataron con TSH (panel superior) o forskolina (Forsk) (panel inferior) durante 24h. El inhibidor de PI3K (LY) fue añadido 1h antes del estímulo a una concentración final de 10 μ M. Tras el tratamiento las células fueron recogidas para la evaluación, mediante un ensayo de retardo en gel, de la cantidad de Pax8 asociado a un oligonucleótido marcado radiactivamente, correspondiente a la secuencia de unión de Pax8 al sitio PB derivado del promotor de *NIS*. La especificidad del complejo formado fue demostrada mediante la competición con un exceso de oligonucleótidos relacionados (R) o no relacionados (NR) y no marcados radiactivamente. Alternativamente la unión de Pax8 al oligonucleótido marcado fue competida con un anticuerpo dirigido contra el sitio de unión de Pax8 al promotor de *NIS*. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

En todos los casos, la especificidad del complejo formado fue determinada mediante la competición de la sonda marcada con un exceso de oligonucleótidos relacionados (Fig. 31, ambos paneles, carriles 4, 9 y 13) o no relacionados (Fig. 31, ambos paneles, carriles 5, 10 y 14). La formación

del complejo también fue competida con un anticuerpo que reconocía el dominio de unión de Pax8 al DNA (Fig. 31, ambos paneles, carril 6), lo que provocaba la desaparición de la banda de retardo demostrando que la proteína Pax8 forma parte del complejo detectado.

Estos resultados demostraron que el mecanismo molecular implicado en la inhibición de la expresión de NIS por los dímeros $G\beta\gamma$ tiene lugar a nivel transcripcional, reduciendo la capacidad de unión de Pax8 a la región NUE del promotor de *NIS*. Además esta reducción está mediada por la enzima PI3K, puesto que su inhibición también aumentó la unión de Pax8 al promotor de *NIS*. Por el contrario, la formación del complejo Pax8/DNA inducida por forskolina, no se vió afectada ni por el bloqueo de la señal $G\beta\gamma$, ni por la inhibición de la PI3K, confirmando que los dímeros $G\beta\gamma$ liberados tras la unión de la TSH a su receptor, son los responsables de la reducción de la unión de Pax8 al promotor de *NIS*, que finalmente promoverá la reducción de la expresión de NIS.

A continuación se estudió la posibilidad de que esta reducción en la cantidad de Pax8 que se unía al promotor de *NIS* fuera debida a una variación en la localización subcelular de Pax8. Para ello se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de Pax8 en células PCCI3 transfectadas con el vector control pcDNA3.1, con las subunidades FLAG- β 1 y HA- γ 2 o con CD8- β ARK, y posteriormente tratadas con TSH durante 24h. El tratamiento con TSH de las células transfectadas con el vector control, provocó un aumento en los niveles de Pax8, cuya localización era predominantemente nuclear. Sin embargo, el tratamiento con TSH de células que expresaban complejos $G\beta$ 1 γ 2, produjo un aumento en la cantidad de Pax8 presente en el citoplasma, efecto que fue prevenido cuando la PI3K fue inhibida. Por su parte, la localización de Pax8 en células que expresaban CD8- β ARK y tratadas con TSH, seguía siendo predominantemente nuclear (Fig. 32).

Estos datos en conjunto indican que los dímeros $G\beta\gamma$ liberados tras la unión de la TSH a su receptor activan la vía de la PI3K, disminuyendo la cantidad de Pax8 que se une al promotor de *NIS* mediante su exclusión del núcleo al citoplasma, lo que provoca finalmente la reducción de la expresión de NIS inducida por TSH.

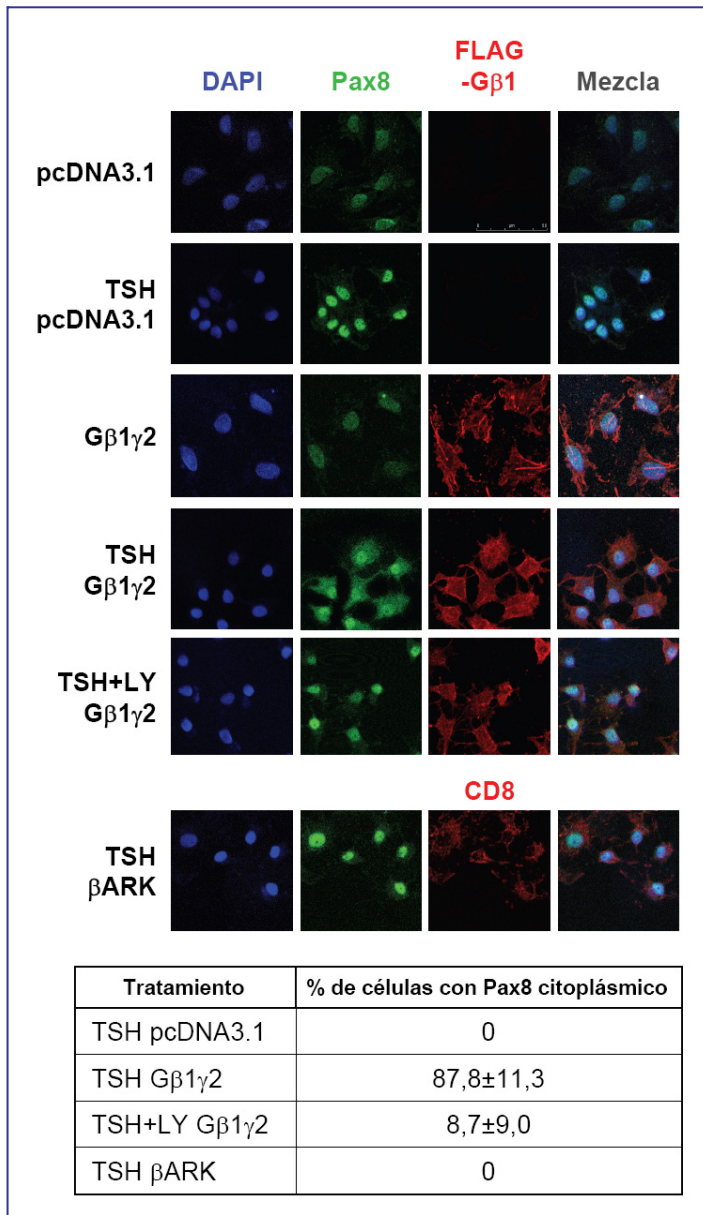


Fig. 32. Efecto de Gβγ sobre la localización de Pax8. Panel superior: Ensayo de inmunofluorescencia representativo. Células PCC13 sembradas en cubreobjetos, fueron transfectadas con 5μg de FLAG-β1 y HA-γ2, o 5μg de CD8-βARK. Se utilizó el vector pcDNA3.1 como control. Tras 48h en medio 4H, las células fueron mantenidas en este medio o fueron tratadas con TSH durante 24h. El inhibidor de PI3K (LY) se añadió 1h antes del tratamiento con TSH. Posteriormente se detectaron los niveles de Pax8/FLAG o Pax8/CD8 mediante inmunofluorescencia, utilizando un microscopio confocal bajo un objetivo de 63 aumentos. Se muestran una serie de fotografías representativas de 3 experimentos independientes en las que se observa la tinción nuclear con DAPI, la inmunodetección de Pax8, FLAG o CD8 y la superposición de cada fila de imágenes. En la 1ª imagen de la 3ª columna se muestra una escala de 0 a 50μm. **Panel inferior:** Cuantificación del porcentaje de células transfectadas con éxito que presentan una localización citoplasmática clara de Pax8. Se realizó a partir de 5 campos diferentes de cada experimento elegidos al azar. Los datos representan la media±S.D. de 3 experimentos independientes.

2. FUNCION DE DARPP-32 EN LA DIFERENCIACION CELULAR TIROIDEA

2.1 DARPP-32 se expresa en células tiroideas

Examinando mRNAs que se expresaban diferencialmente en células tiroideas diferenciadas y no diferenciadas, en nuestro laboratorio se aisló por RT-PCR un cDNA correspondiente a DARPP-32, que codifica para una proteína con capacidad de inhibir alternativamente a la PP1 o a la PKA en neuronas dopaminoceptivas de regiones específicas del cerebro. Para confirmar la observación inesperada de la expresión de este gen en tiroides, se realizó un ensayo de Northern-blot con extractos de RNA de la línea celular tiroidea FRTL-5, de la línea de fibroblastos de rata Rat1 y de tejido fetal de pulmón como controles negativos, utilizando una sonda específica de DARPP-32 de rata. Los resultados confirmaron que DARPP-32 se expresaba en células tiroideas y no en fibroblastos o en tejido pulmonar (Fig. 33A).

Para confirmar que DARPP-32 se expresaba en tejido tiroideo primario y que el mRNA detectado se traducía a proteína, se realizó un ensayo de Western-blot utilizando un anticuerpo específico para DARPP-32 y extractos proteicos de tejido tiroideo y de tejido cerebral como control positivo. Los resultados confirmaron que DARPP-32 se expresaba en ambos casos, así como en la línea celular tiroidea PCCL3 (Fig. 33B). Los altos niveles de expresión de DARPP-32 encontrados en células PCCL3, en comparación con los detectados en tejido tiroideo primario, podrían ser debidos a múltiples razones, por ejemplo, la expresión en el tejido podría estar restringida sólo a algunas células de determinados folículos, como ha sido descrito para otras proteínas como TPO o DUOX (Gerard, 2002). También podría ser debido a la heterogeneidad del tejido extraído o a la presencia de reguladores en el animal completo que estarían ausentes en las células en cultivo.

Aunque en neuronas DARPP-32 se localiza en la fracción soluble del citoplasma, en el paratiroides se encuentra asociada a la fracción de membrana intracelular (Matovcik, 1995). Para determinar la sublocalización celular de DARPP-32 en tiroides, se fraccionaron extractos proteicos de la línea celular PCCL3 y se analizaron mediante Western-blot. Al igual que sucedía en tejido neuronal, la mayoría de la proteína se localizaba en la fracción citoplasmática soluble (EC) mientras que al contrario de lo que ha sido descrito en paratiroides, se encontraba ausente de la fracción de membrana (EM) (Fig. 33C).

Además, la observación al microscopio confocal de células incubadas con anticuerpo anti-DARPP-32 (Fig. 45), revela que la mayoría de la proteína es citoplasmática con un fondo nuclear que también puede ser observado en células en las que DARPP-32 es indetectable por Western-blot.

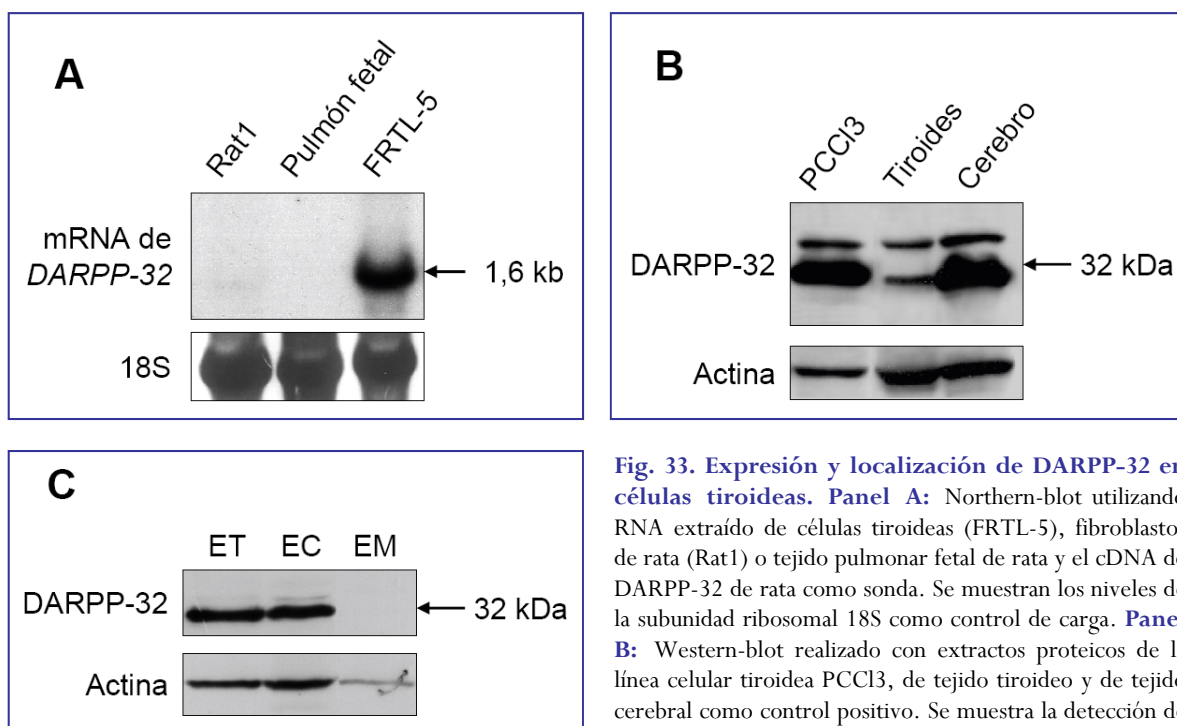


Fig. 33. Expresión y localización de DARPP-32 en células tiroideas. **Panel A:** Northern-blot utilizando RNA extraído de células tiroideas (FRTL-5), fibroblastos de rata (Rat1) o tejido pulmonar fetal de rata y el cDNA de DARPP-32 de rata como sonda. Se muestran los niveles de la subunidad ribosomal 18S como control de carga. **Panel B:** Western-blot realizado con extractos proteicos de la línea celular tiroidea PCC13, de tejido tiroideo y de tejido cerebral como control positivo. Se muestra la detección de los niveles de DARPP-32 y de actina como control de carga.

Panel C: Western-blot realizado con extractos de proteína fraccionados de células PCC13, utilizando anticuerpos específicos de DARPP-32 y de actina como control de carga. ET: Extractos totales, EC: Extractos citoplasmáticos y EM: Extractos de membrana.

2.2 La expresión de DARPP-32 se relaciona con el grado de diferenciación celular tiroidea

En los experimentos de RT-PCR preliminares, se observó que DARPP-32 se expresaba fuertemente en líneas celulares tiroideas diferenciadas, mientras que estaba ausente en la línea celular tiroidea FRTL-5 transformada con los oncogenes *H* y *K-Ras* (Fusco, 1987), así como en la línea celular FRO, proveniente de un tumor tiroideo humano (Fagin, 1993). Tampoco se expresaba en la línea celular tiroidea de rata FRT, que presenta un fenotipo epitelial polarizado, aunque carece de las propiedades funcionales de las células tiroideas (Mascia, 1997).

Mediante un ensayo de Northern-blot utilizando un cDNA de DARPP-32 como sonda y extractos de RNA de las líneas celulares descritas anteriormente, se confirmó que DARPP-32 no se expresaba, o se expresaba a niveles apenas detectables, en las líneas celulares tiroideas no diferenciadas (Fig. 34A). Los niveles de mRNA de DARPP-32 disminuían en paralelo con el grado de diferenciación. Comparados con los altos niveles de mRNA detectados en células FRTL-5 diferenciadas, éstos eran apenas detectables en células FRTL-5 transformadas con el oncogén *H-Ras*, mientras que desaparecían completamente en células FRTL-5 transformadas con el oncogén *K-Ras*. Estos resultados sugerían que la expresión de DARPP-32 se silenciaba durante el proceso de transformación. Su

expresión también se perdía en células FRT, que aunque no están transformadas, presentan un fenotipo no diferenciado, reforzando la correlación entre pérdida de expresión de DARPP-32 y pérdida de diferenciación. De acuerdo con este resultado, los niveles de proteína de DARPP-32 también eran indetectables en células FRT, FRO y en células FRTL-5 transformadas con *K-Ras*; y estaban severamente reducidos en células FRTL-5 transformadas con el oncogén *H-Ras*, en comparación con las líneas celulares diferenciadas FRTL-5 y PCC13 (Fig. 34B).

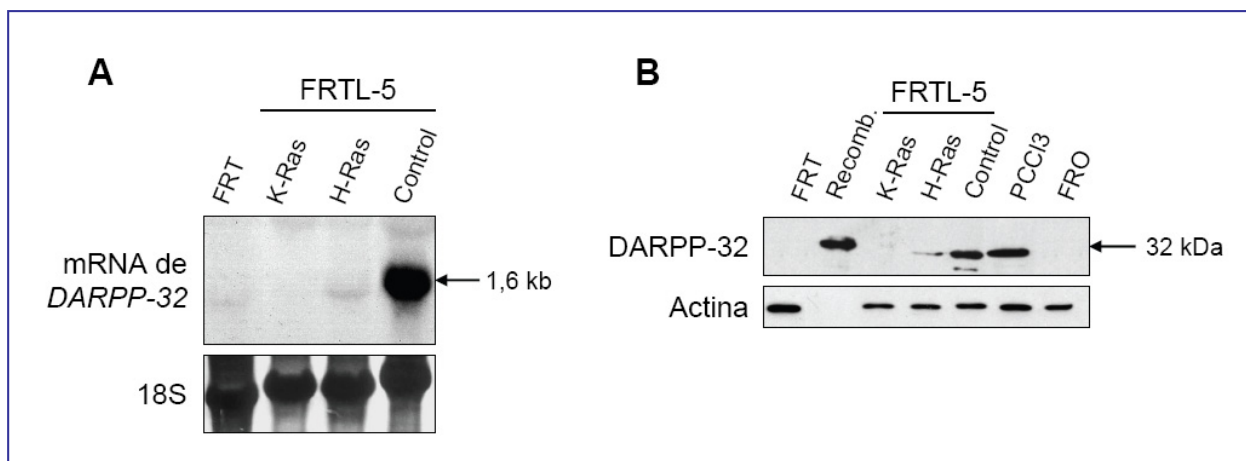


Fig. 34. Expresión de DARPP-32 en células tiroideas diferenciadas y no diferenciadas. Panel A: Ensayo de Northern-blot realizado con RNA derivado de células tiroideas no diferenciadas (FRT) y de células tiroideas FRTL-5 diferenciadas (Control) o transformadas con *K-Ras* o *H-Ras*, utilizando el cDNA de DARPP-32 de rata como sonda. Se muestra la expresión de la subunidad ribosomal 18S como control de carga. **Panel B:** Ensayo de Western-blot realizado con extractos proteicos de las líneas celulares indicadas, utilizando anticuerpos específicos para la detección de DARPP-32 y de actina como control de carga. Se utilizó la proteína recombinante producida en bacterias como control positivo.

Aunque la pérdida de diferenciación de la línea tumoral FRO y de las líneas celulares transformadas con Ras estaba directamente relacionada con la supresión de la expresión de DARPP-32, ésta podría ser un evento secundario consecuencia del proceso de transformación. Sin embargo el hecho de que la línea celular FRT, que presenta un fenotipo no diferenciado a pesar de no haber sufrido un proceso de transformación, tampoco expresara DARPP-32, planteó la posibilidad de que esta proteína pudiera desempeñar una función importante en el proceso de diferenciación celular tiroidea. Para confirmar que la expresión de DARPP-32 también estaba relacionada con el grado de diferenciación de células tiroideas no transformadas, se realizó un ensayo de Western-blot con extractos procedentes de células PCC13 cultivadas en medio 4H ó 6H. Estas células cultivadas en ausencia de estímulos mostraron una gran reducción en los niveles de DARPP-32 comparados con los niveles de células diferenciadas (Fig. 35).

De nuevo, los niveles de DARPP-32 estaban relacionados con el grado de diferenciación, en esta ocasión con el de células no transformadas que responden a los estímulos de TSH e IGF-1 para diferenciarse, lo que sugería que podría ser necesario un control preciso de su expresión, para que se produzca una correcta diferenciación de las células tiroideas.

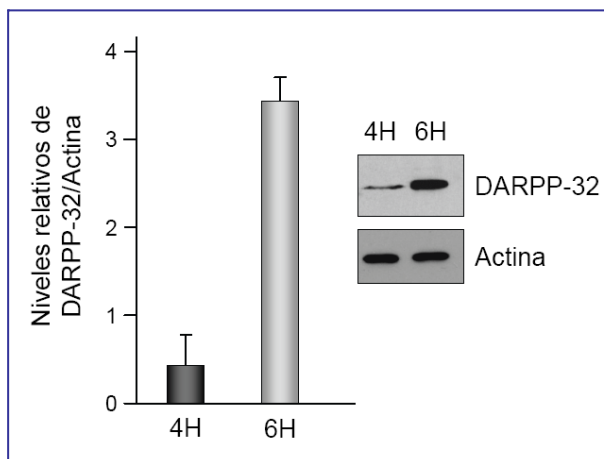


Fig. 35. Expresión de DARPP-32 en células PCC13. Se cultivaron células PCC13 en medio 4H, para mantenerlas en un estado no diferenciado, o en medio 6H, para promover su diferenciación. Posteriormente las células fueron recolectadas para la detección mediante Western-blot de los niveles de DARPP-32 y de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo y la representación de la media \pm S.D. realizada a partir de 3 experimentos independientes, de los niveles de DARPP-32 normalizados con respecto a los del control de carga.

2.3 La pérdida de expresión de DARPP-32 provoca la pérdida de diferenciación de células tiroideas

Nuestros resultados han demostrado que las células PCC13 diferenciadas presentaban una expresión elevada de DARPP-32, y que su expresión estaba fuertemente relacionada con el grado de diferenciación de diversas líneas celulares, lo que planteaba la posibilidad de que DARPP-32 tuviera una función importante mediando las señales diferenciadoras de TSH e insulina/IGF-1. Para estudiar esta cuestión, se utilizó siRNA (small interference RNA) para silenciar la expresión de DARPP-32 en células tiroideas diferenciadas, en las que se analizó si la expresión de los distintos marcadores de diferenciación tiroidea estaba afectada por la pérdida de la proteína. Se transfectaron células PCC13 con un vector pSuper modificado, que expresaba la proteína fluorescente verde (GFP) junto a un siRNA específico para DARPP-32 (pSGD) o un siRNA control dirigido contra la luciferasa (pSGL). Utilizando extractos proteicos de células PCC13 transfectadas con ambos vectores, se analizaron los niveles de DARPP-32 y de los marcadores de la diferenciación tiroidea NIS y Pax8 mediante Western-blot. Los niveles de DARPP-32 estaban considerablemente reducidos en las células transfectadas con el vector de expresión del siRNA de DARPP-32, en comparación con el de las células transfectadas con el vector control. Los niveles de NIS presentaban una fuerte reducción en las células en las que la expresión de DARPP-32 había sido silenciada, con respecto a los de las células control (Fig. 36A).

La expresión de los marcadores finales de la diferenciación tiroidea, como es el caso de NIS, depende en parte de la actividad del factor de transcripción Pax8. Se analizó mediante Western-blot, si los niveles de Pax8 estaban afectados por la pérdida de expresión de DARPP-32. Se observó que la pérdida de expresión de DARPP-32 en células transfectadas con el vector de expresión del siRNA de DARPP-32, provocó una fuerte disminución de los niveles de Pax8 con respecto a los de

células transfectadas con el vector control (Fig. 36B). Los resultados son consistentes con un modelo en el que la depleción de DARPP-32 provocaría la pérdida de expresión de Pax8, que tendría como consecuencia la pérdida de expresión de NIS.

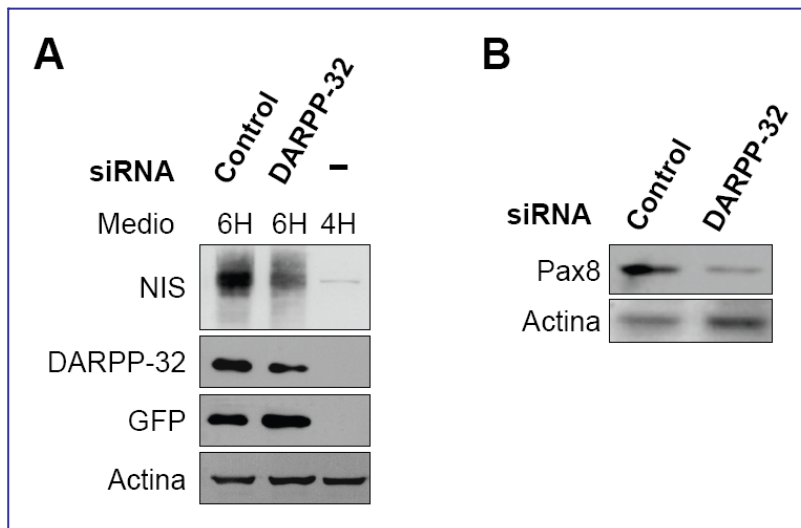


Fig. 36. Efecto de la pérdida de expresión de DARPP-32 sobre los niveles de NIS y Pax8. Ensayos de Western-blot utilizando extractos de células PCC13 transfectadas con el vector que expresa el RNA de interferencia para inhibir la expresión de DARPP-32 o de luciferasa (Control), creciendo en medio 6H. Se utilizaron extractos de células no diferenciadas como control negativo (4H). Se muestra la detección de DARPP-32, de NIS (Panel A) y Pax8 (Panel B) como marcadores de la diferenciación tiroidea, de GFP como control de la eficiencia de la transfección y de actina como control de carga.

Los resultados obtenidos utilizando los vectores de expresión pSGL y pSGD fueron confirmados mediante la transfección de un oligorribonucleótido de interferencia (siRNA) específico de DARPP-32. La eficacia del siRNA a la hora de eliminar la expresión de DARPP-32 fue mucho mayor a la obtenida con las construcciones derivadas del vector pSuper: La expresión de DARPP-32 fue eliminada completamente 24h después de la transfección con un siRNA específico. Los niveles de DARPP-32 seguían siendo apenas detectables durante los 3 primeros días tras la transfección, y se recuperaban paulatinamente, hasta alcanzar niveles comparables a los de las células transfectadas con el siRNA control, 7 días después de la transfección. En estas condiciones se detectó la expresión de distintos marcadores de la diferenciación tiroidea mediante Western-blot. La eliminación de DARPP-32 provocó la disminución de los niveles de Tg y de NIS, así como del factor de transcripción TTF-1, que al igual que Pax8 controla la expresión de los genes marcadores de la diferenciación tiroidea. La expresión de estas proteínas se recuperaba con el tiempo en paralelo con la de DARPP-32 (Fig. 37).

La detección mediante inmunofluorescencia de DARPP-32 y Tg confirmó los resultados observados en los ensayos de Western-blot. Tanto DARPP-32 como Tg se expresaban fuertemente en las células control, la eliminación de la expresión de DARPP-32 utilizando un siRNA específico, provocó una drástica reducción en la expresión de Tg después de 24h. La expresión de ambas proteínas se recuperaba con el paso del tiempo, de modo que, a día 2 se observaron algunas células que expresaban DARPP-32, en las que también se detectaba la expresión de Tg. La proporción de células que expresaban ambas proteínas aumentaba con el tiempo (Fig. 38).

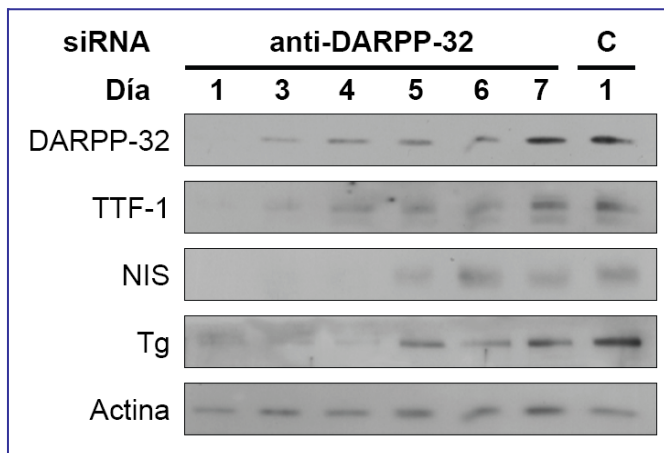


Fig. 37. Efecto de la eliminación de la expresión de DARPP-32 sobre los niveles de varios marcadores de la diferenciación tiroidea. Se transfectoron células PCCl3 con un siRNA para eliminar la expresión de DARPP-32 o con un siRNA control (C). Las células fueron recolectadas cada 24h hasta llegar a los 7 días para el análisis mediante Western-blot de los niveles de DARPP-32, TTF-1, NIS, Tg y actina como control de carga.

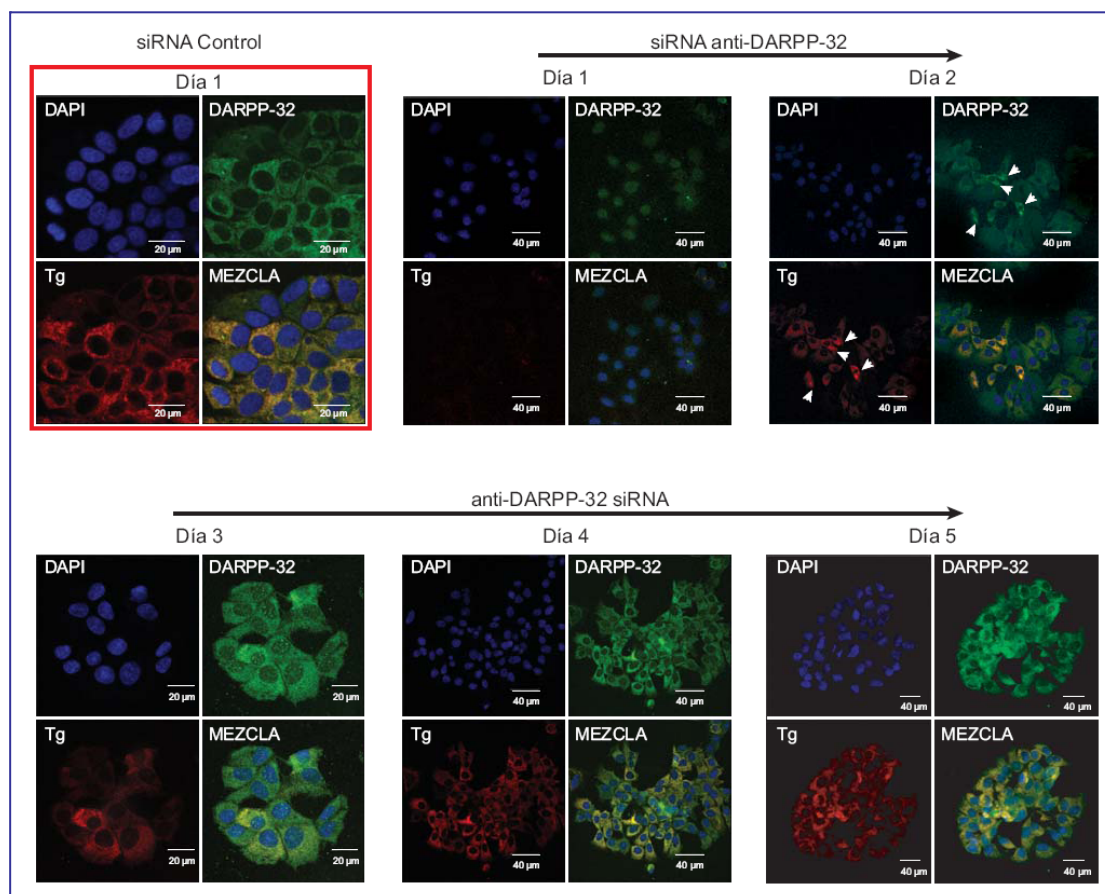


Fig. 38. Efecto de la eliminación de la expresión de DARPP-32 sobre los niveles de Tg. Se transfectoron células PCCl3 con un siRNA específico para eliminar la expresión de DARPP-32 o con un siRNA control. Las células fueron recolectadas 24h después de la transfección y cada 24h hasta el día 5, e incubadas con anticuerpos para detectar la expresión de DARPP-32 (verde) y Tg (rojo) mediante inmunofluorescencia. Se muestra la tinción nuclear con DAPI y la superposición de las 3 imágenes. En las imágenes se observa una escala de 20 ó 40μm.

Por tanto, los resultados obtenidos utilizando los vectores de expresión derivados de pSuper y el siRNA para eliminar la expresión de DARPP-32, proporcionaron evidencias de una importante función de DARPP-32 en el mantenimiento de la diferenciación celular tiroidea. La presencia de DARPP-32 es necesaria para que se produzca la expresión de las proteínas marcadoras de la diferenciación celular tiroidea y de los factores de transcripción que regulan su expresión.

2.4 La expresión de DARPP-32 en células transformadas con *Ras* recupera su fenotipo diferenciado

Tras la pérdida de DARPP-32, las células tiroideas pierden la expresión de marcadores de diferenciación como Tg o NIS, lo que sugiere que DARPP-32 es necesaria para promover una diferenciación celular tiroidea completa. Ya que DARPP-32 es necesaria para la expresión de la Tg, la introducción de DARPP-32 en células transformadas con *Ras*, que han perdido la expresión de DARPP-32 y de Tg, podría permitir la reactivación del promotor de la *Tg*. Para estudiar esta posibilidad, células transformadas con el oncogén *H-Ras* fueron transfectadas transitoriamente con el vector de expresión pEGFP-DARPP-32 y un vector de expresión del gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de la *Tg*. De acuerdo con estudios previos (Francis-Lang, 1992b), la expresión exógena de TTF-1 no era suficiente para activar al promotor de la *Tg* en células transformadas con *H-Ras*. Sin embargo, la expresión exógena de DARPP-32 permitió una activación de 2,5 veces en la actividad del promotor de la *Tg* y la cotransfección de un vector de expresión de TTF-1 indujo aumentos ligeramente superiores (Fig. 39A).

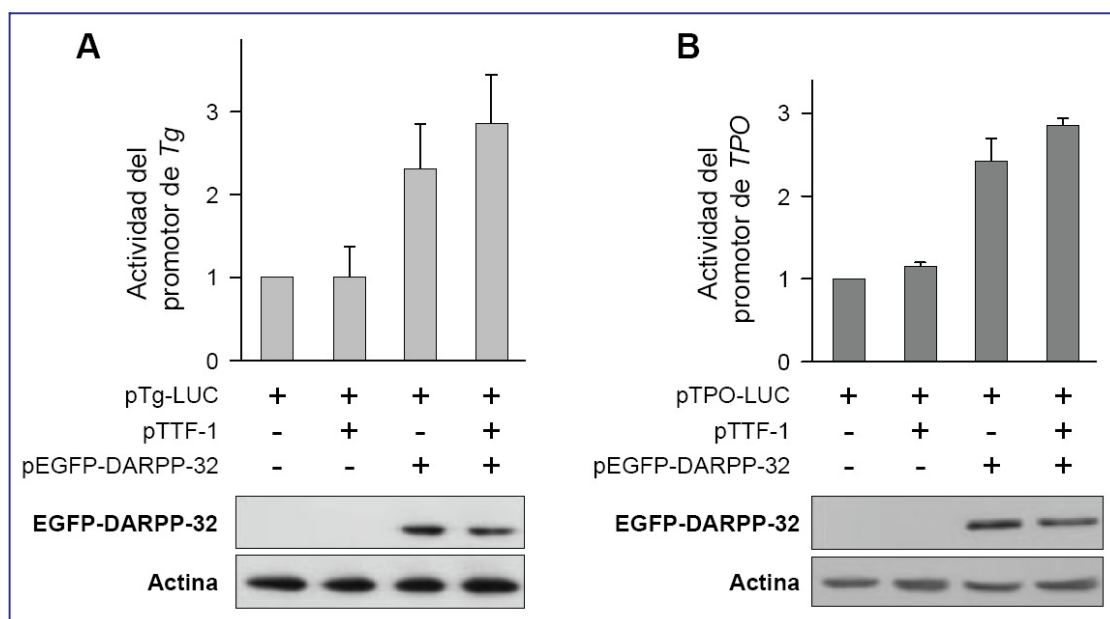


Fig. 39. Activación de los promotores de *Tg* y *TPO* en células transformadas con el oncogén *H-Ras*. Se transfectaron células PCC13, transformadas con el oncogén *H-Ras*, con 3 μ g del vector hTGenh/prm-Luc (Panel A) o del vector pTPO-LUC (Panel B), 0,5 μ g de pRL-TK, 3 μ g de EGFP-DARPP-32 y 3 μ g de pTTF-1 donde se indica (+). Tras la transfección las células fueron recolectadas para el análisis de la actividad luciferasa y renilla. La actividad de los promotores se expresó como el número de veces de inducción sobre los niveles (=1) de células transfectadas con el vector control. Los datos representan la media \pm S.D. (n=3) de un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. En la parte inferior de la figura se muestra la expresión, detectada mediante Western-blot, de DARPP-32 como control de la eficiencia de la transfección y de actina como control de carga.

En trabajos previos se sugería que el equilibrio entre kinasas y fosfatasa necesario para mantener activo a TTF-1, se perdía en células tiroideas transformadas con *H-Ras*, como se desprendía del patrón alterado en la fosforilación de TTF-1 observado en estas células (Velasco, 1998). La expresión exógena de DARPP-32 podría recuperar el equilibrio entre kinasas/fosfatasa de las células transformadas con *H-Ras*, permitiendo la presencia de suficiente TTF-1 activo para inducir la activación del promotor de la *Tg*.

La expresión de la TPO, otro marcador de la diferenciación tiroidea, también está silenciada en células tiroideas transformadas con el oncogén *H-Ras*. La expresión de DARPP-32 indujo un aumento de unas 2 veces en la actividad del promotor de la *TPO*, y al igual que sucedió con el promotor de la *Tg*, la coexpresión de TTF-1 aumentó ligeramente la actividad del promotor (Fig. 39B). Estos resultados confirman que DARPP-32 juega un papel esencial en las rutas de señalización que promueven la diferenciación celular tiroidea.

2.5 TSH e IGF-1 controlan la expresión de DARPP-32

Ya que la TSH y el IGF-1 son los estímulos fisiológicamente más relevantes como inductores de la diferenciación tiroidea, y en este estudio se ha demostrado que la expresión de DARPP-32 es necesaria para su mantenimiento, se analizó si estos estímulos eran capaces de controlar la expresión de DARPP-32. Para ello células PCCL3, cultivadas en medio 4H durante 8 días, se estimularon durante 24h con TSH y/o IGF-1. Tanto la TSH como el IGF-1 indujeron aumentos en los niveles de DARPP-32, aunque la estimulación con ambos factores no produjo aumentos aditivos en los niveles de la proteína (Fig. 40), lo que situaría a DARPP-32 como una diana común de las rutas de señalización que controlan la diferenciación de las células tiroideas.

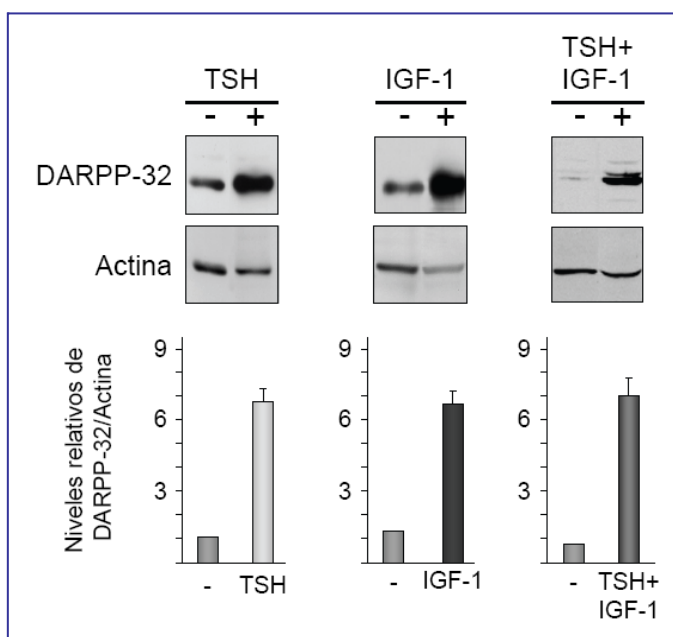


Fig. 40. Control de la expresión de DARPP-32 por TSH y/o IGF-1. Se cultivaron células PCCL3 en medio 4H durante 8 días y a continuación se estimularon con TSH, IGF-1 o ambos durante 24h. Posteriormente las células fueron recogidas y se detectaron mediante Western-blot los niveles de DARPP-32 y de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo y la media \pm S.D., realizada a partir de 3 experimentos independientes, de los niveles de DARPP-32 normalizados con respecto a los del control de carga.

2.6 Las vías de la PKA y de la PI3K están implicadas en el control de la expresión de DARPP-32 en respuesta a TSH e IGF-1

Para analizar las vías de señalización implicadas en el control de la expresión de DARPP-32, se utilizaron inhibidores específicos de proteínas kinasas activadas en respuesta a TSH o a IGF-1. En primer lugar se evaluó el papel de la PKA en la regulación de la expresión de DARPP-32, para lo que se utilizó el compuesto H89, un inhibidor de la PKA. Se cultivaron células PCCl3 en medio 4H y posteriormente se trataron durante 30min con H89 a una concentración final de 10 μ M, seguidas de la estimulación con TSH durante 24h. La inhibición de PKA provocó la pérdida de la inducción de DARPP-32 en respuesta a TSH (Fig. 41).

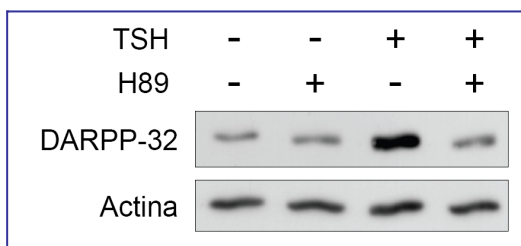


Fig. 41. Efecto de la inhibición de PKA sobre la expresión de DARPP-32 inducida por TSH. Se cultivaron células PCCl3 en medio 4H durante 8 días, a continuación se trataron durante 30min con H89 a una concentración final de 10 μ M, seguidas de la estimulación con TSH durante 24h. Posteriormente las células fueron recogidas para el análisis mediante Western-blot de los niveles de DARPP-32 y de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

La ruta de la PI3K ejerce un papel importante en la transducción de señales de la célula tiroidea en respuesta a IGF-1. Se ha descrito la existencia de una comunicación cruzada entre las vías activadas por TSH e IGF-1 (Dremier, 2002), siendo este último un factor permisivo para la acción mitogénica de la TSH. También se ha descrito la activación de esta vía en respuesta a TSH (Cass, 2000) por mecanismos dependientes e independientes de cAMP, como se ha demostrado en la primera parte de este trabajo. Para determinar si la vía de la PI3K cumplía alguna función en la regulación de la expresión de DARPP-32, se trataron células PCCl3 cultivadas en medio 4H con LY294002 (LY), un inhibidor de la PI3K, durante 30min a una concentración final de 10 μ M. La inducción de los niveles de DARPP-32 en respuesta a TSH disminuyó drásticamente cuando la PI3K fue inhibida, mientras que en respuesta a IGF-1 no sólo no se produjo aumento alguno, sino que se perdieron completamente los niveles basales de la proteína (Fig. 42).

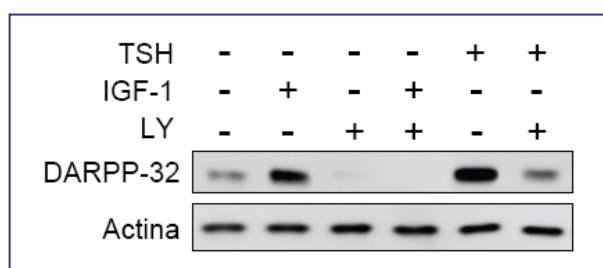


Fig. 42. Efecto de la inhibición de PI3K sobre la expresión de DARPP-32 inducida por TSH e IGF-1. Se cultivaron células PCCl3 en medio 4H durante 8 días y a continuación se trataron 30min con LY294002 (LY) a una concentración final de 10 μ M, seguidas de la estimulación con TSH o IGF-1 durante 24h. Posteriormente las células fueron recogidas para el análisis mediante Western-blot de los niveles de DARPP-32 y de actina como control

de carga. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes.

El hecho de que la inhibición de la vía de la PI3K bloqueara tanto la capacidad de inducción de la proteína como el mantenimiento de sus niveles basales en respuesta a IGF-1, podría indicar que la activación de esta vía es importante para la estabilización bien del mRNA o bien de la proteína.

2.7 Tanto la TSH como el IGF-1 inducen la fosforilación de DARPP-32 en el residuo de Thr34

Hasta este punto fuimos capaces de bloquear la diferenciación de células tiroideas silenciando la expresión de DARPP-32, y de promover la diferenciación de células que expresaban DARPP-32 a niveles muy reducidos, mediante la expresión exógena de la proteína. Además tanto TSH como IGF-1, los estímulos fisiológicamente más relevantes para la diferenciación tiroidea, inducían la acumulación de DARPP-32. La función de DARPP-32, no obstante depende de su estado de fosforilación: Cuando está fosforilada en el residuo de Thr75, DARPP-32 funciona como un inhibidor de la PKA. Alternativamente, la fosforilación del residuo de Thr34, convierte a DARPP-32 en un inhibidor de la PP1 (Bibb, 1999; Hemmings, 1984). Por tanto, el estado de fosforilación de DARPP-32 dirige la señalización celular hacia aumentos de fosforilación o desfosforilación de los sustratos de la PKA y de la PP1.

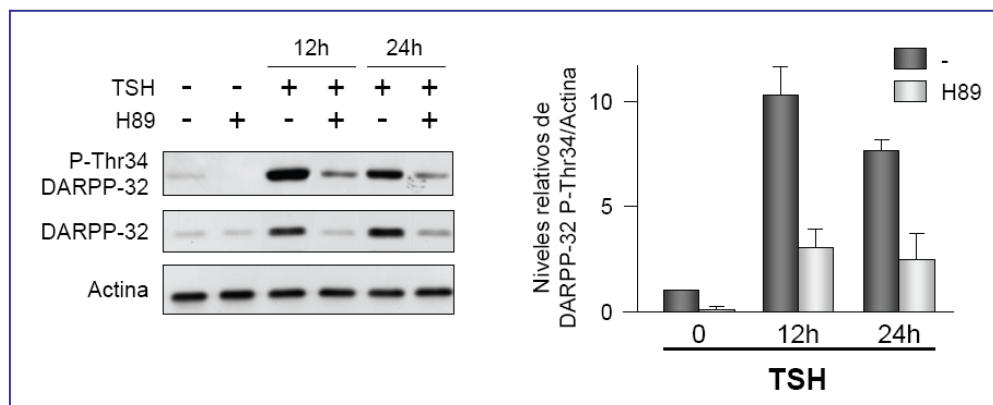


Fig. 43. Regulación de los niveles de DARPP-32 P-Thr34 en respuesta a TSH. Se cultivaron células PCCL3 en medio 4H durante 8 días y a continuación se trataron con TSH durante 12 ó 24h. El inhibidor de la PKA (H89) fue añadido 30min antes del tratamiento con TSH a una concentración final de 10 μ M. Posteriormente las células fueron recolectadas y se detectaron mediante Western-blot los niveles de DARPP-32 P-Thr34, de DARPP-32 y de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo y la media \pm S.D., realizada a partir de 3 experimentos independientes, de los niveles de DARPP-32 P-Thr34 normalizados con respecto a los del control de carga.

No fue posible detectar DARPP-32 P-Thr75 en nuestras células, en cambio la forma de DARPP-32 fosforilada en el residuo Thr34 fue fácilmente detectable. El tratamiento con TSH indujo un fuerte aumento en los niveles de DARPP-32 P-Thr34, que alcanzó un máximo a las 12h y se mantuvo en niveles elevados hasta 24h después del tratamiento hormonal. La inhibición de la vía de

la PKA bloqueó la inducción de los niveles de la proteína fosforilada tanto a las 12 como a las 24h de tratamiento (Fig. 43). En respuesta a IGF-1, también se observó una clara inducción en los niveles de DARPP-32 P-Thr34 tras 12h de tratamiento, que en este caso se mantuvo e incluso aumentó tras 24h de estimulación (Fig. 44).

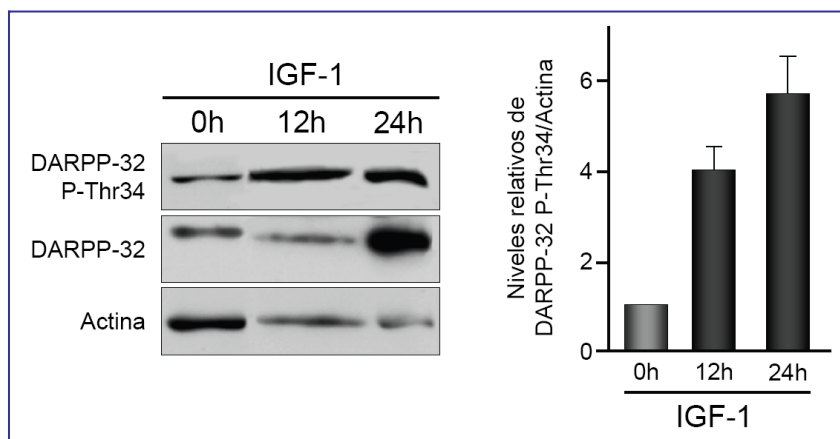


Fig. 44. Inducción de los niveles de DARPP-32 P-Thr34 en respuesta a IGF-1.

Se cultivaron células PCCL3 en medio 4H durante 8 días y a continuación se trataron con IGF-1 durante 12 ó 24h. Posteriormente las células fueron recogidas y se detectaron mediante Western-blot los niveles de DARPP-32 P-Thr34, de DARPP-32 y de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo y la media \pm S.D., realizada a partir de 3 experimentos independientes, de los niveles de DARPP-32 P-Thr34 normalizados con respecto a los del control de carga.

La inhibición de la vía de la PI3K bloqueó parcialmente la fosforilación de DARPP-32 inducida por TSH. Cualquier efecto de la inhibición de la PI3K sobre la fosforilación de DARPP-32 inducida por IGF-1 fue difícil de asegurar puesto que, como se observó previamente, el bloqueo de esta vía eliminaba completamente los niveles de la proteína (Fig. 42). Consecuentemente con esta observación, fue imposible detectar la presencia de DARPP-32 fosforilada en el residuo de Thr34 cuando la PI3K fue inhibida (Fig. 45).

Estos datos sugieren que tanto la TSH como el IGF-1 son capaces de inducir la expresión de DARPP-32 y de promover su fosforilación en el residuo de Thr34 permitiendo su actuación como un inhibidor potente y selectivo de la fosfatasa PP1, y por tanto amplificando la señal diferenciadora de la vía cAMP/PKA. Sugieren además la existencia de una comunicación cruzada entre las vías de señalización activadas por ambos estímulos, que desemboca en el control de la expresión y del estado de fosforilación de DARPP-32. La activación de las vías de la PKA y de la PI3K parece ser crucial tanto para la inducción de la expresión de DARPP-32, como para la inducción de su fosforilación en el residuo de Thr34.

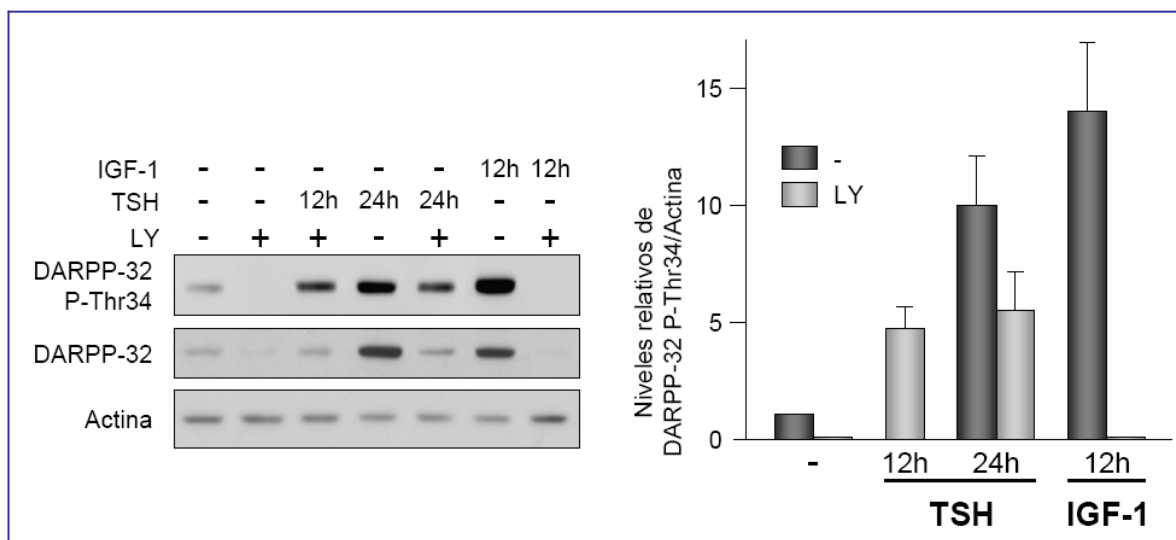


Fig. 45. Efecto de la inhibición de PI3K sobre los niveles de DARPP-32 P-Thr34. Se cultivaron células PCCL3 en medio 4H durante 8 días y a continuación se trataron con TSH o IGF-1 durante 12 ó 24h. El inhibidor de PI3K LY294002 (LY) fue añadido a una concentración final de 10 μ M, 30min antes de añadir los estímulos. Posteriormente las células fueron recogidas y se detectaron mediante Western-blot los niveles de P-Thr34-DARPP-32, de DARPP-32 y de actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo y la media \pm S.D., realizada a partir de 3 experimentos independientes, de los niveles de P-Thr34-DARPP-32 normalizados con respecto a los del control de carga.

Conclusiones

1. Los dímeros $G\beta\gamma$ liberados tras la activación del TSHR disminuyen la expresión de NIS inducida por la TSH, pero no afectan a la expresión de la Tg.
2. Los complejos $G\beta\gamma$ responsables de la inhibición de la expresión de NIS son liberados tras la activación de proteínas de tipo Gs.
3. El tratamiento con TSH promueve la activación de la vía de la PI3K de manera independiente de cAMP.
4. Los dímeros $G\beta\gamma$ liberados en respuesta a TSH inducen la activación de la vía de la PI3K.
5. La señalización desencadenada por $G\beta\gamma$ no afecta al aumento de los niveles de Pax8 inducidos por TSH, pero disminuye la unión de Pax8 al promotor de NIS.
6. La expresión de $G\beta\gamma$ promueve la exclusión de Pax8 del núcleo de manera dependiente de PI3K.
7. DARPP-32 se expresa en el citoplasma de células tiroideas diferenciadas.
8. La expresión de DARPP-32 está directamente relacionada con el grado de diferenciación de células tiroideas.
9. La eliminación de DARPP-32 mediante RNAi provoca la pérdida de expresión de los marcadores de la diferenciación celular tiroidea Tg y NIS y de los factores de transcripción TTF-1 y Pax8. Por el contrario, la reexpresión de DARPP-32 revierte el fenotipo no diferenciado de células transformadas con el oncogén *H-Ras*.
10. Tanto la expresión de DARPP-32 como la fosforilación de su residuo de Thr34, están controladas por TSH e IGF-1, a través de las vías de la PKA y de la PI3K.

Discusión

1. Función de los dímeros $G\beta\gamma$ en la diferenciación celular tiroidea dependiente de TSH.

En el presente estudio, se ha descrito la función de los dímeros $G\beta\gamma$ en la señalización dependiente de TSH en células tiroideas. Los dímeros $G\beta\gamma$ liberados tras el tratamiento con TSH promueven la activación de la vía de PI3K/Akt y regulan la expresión de NIS en células PCCl3. En un estudio previo de nuestro laboratorio, se describió el aumento de la inducción de la expresión de NIS en respuesta a TSH cuando la PI3K era inhibida (García, 2002). Aquellos resultados sugerían la existencia de una ruta que conectaba a la TSH con la activación de la vía de la PI3K y que tenía como consecuencia la inhibición de la expresión de NIS. En este trabajo se confirma esta hipótesis, bloqueando la señalización a través de $G\beta\gamma$ mediante el uso de dos inhibidores competitivos, CD8- β ARK y $G\alpha T$. La expresión de estas moléculas provocó un aumento en la actividad del promotor de NIS inducida por TSH, pero no afectó a la actividad del promotor de NIS en respuesta a forskolina, un activador directo de la enzima AC, reforzando la idea de que los dímeros $G\beta\gamma$ acoplados al TSHR activan una vía de señalización que lleva a la inhibición de la expresión de NIS. La mayor parte de este estudio se ha realizado con la construcción CD8- β ARK, que codifica para una proteína quimérica formada por el dominio C-terminal de la proteína β ARK1, donde se localiza la región de unión con alta afinidad a dímeros $G\beta\gamma$, fusionado con los dominios extracelular y transmembrana de la proteína CD8, lo que permite que sea dirigida a la membrana plasmática, donde es capaz de interactuar y unirse a complejos $G\beta\gamma$, actuando como un bloqueador efectivo y específico de su señal (Koch, 1994). La posibilidad de utilizar técnicas de interferencia de RNA se descartó debido a dos razones: Por un lado no se conocen las isoformas de $G\beta$ y $G\gamma$ que se expresan en tejido tiroideo, y tampoco se sabe cuales de ellas se asocian específicamente con el TSHR. Por otro lado, se ha descrito que la eliminación de las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ mediante RNAi también elimina la señalización mediada por las subunidades $G\alpha$ (Hwang, 2005).

En una aproximación experimental complementaria, la sobreexpresión del dímero $G\beta 1\gamma 2$ provocó la disminución de la expresión de NIS en respuesta a TSH. Esto podría deberse a la disminución de los niveles de cAMP, provocada por la interacción de $G\beta 1\gamma 2$ con dos de sus efectores descritos: $G\alpha s$ y AC, o a un efecto directo de los complejos $G\beta 1\gamma 2$. En cuanto a su posible acción sobre la AC, se ha descrito que determinadas combinaciones de dímeros $G\beta\gamma$ pueden alterar la actividad de isoformas concretas de la AC (Sunahara, 1996). Se ha descrito la expresión mayoritaria de las isoformas III, VI y IX de la AC en tejido tiroideo de humano y de perro (Vanvooren, 2000). De estas tres isoformas, solamente la segunda parece ser inhibida por $G\beta\gamma$ (Bayewitch, 1998a), aunque no se descarta que este efecto sea debido a una acción indirecta. En nuestro sistema de estudio no obstante, ni la expresión de $G\beta 1\gamma 2$, ni el secuestro de los dímeros liberados tras la activación del

receptor, modificaron el grado de inducción de los niveles de cAMP o la activación de una construcción quimera (CRE-LUC) de respuesta a cAMP. Estos datos nos llevaron a concluir que la inhibición de la expresión de NIS mediada por $G\beta\gamma$ en respuesta a TSH, es debida a una acción directa de éstos y no a una disminución de los niveles de cAMP.

Aunque las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular tiroidea han sido ampliamente estudiadas (Medina, 2000a), al margen de la vía del cAMP/PKA no se dispone de información detallada sobre las cascadas de señales que regulan la diferenciación celular tiroidea. Se ha descrito que factores tales como insulina/IGF-1, aumentan la expresión de Tg, TPO y TSHR en respuesta a TSH (Santisteban, 1987; Shimura, 1994; Zarrilli, 1990) y por el contrario, en nuestro laboratorio se demostró que la expresión de NIS es inhibida por insulina/IGF-1 (García, 2002), siendo este efecto mediado por la vía de la PI3K. Esto indica que la PI3K regula la expresión de Tg y de NIS mediante mecanismos diferentes. Del mismo modo, la nueva vía de señalización descrita en este trabajo no parece regular del mismo modo a otros genes marcadores de la diferenciación tiroidea, como la *Tg*. Al igual que la expresión de NIS, la expresión de Tg es estimulada por la vía de TSH/cAMP, pero al contrario de lo que sucede con NIS, Pax8 no parece ser el factor de transcripción más importante en la regulación de su expresión.

Se ha descrito que los dímeros $G\beta\gamma$ regulan un gran número de efectores, incluyendo a distintas isoformas de la familia de las PI3Ks (Kerchner, 2004; Murga, 2000). Esta es una gran familia de kinasas lipídicas que se ha dividido en tres clases. Tienen la capacidad de fosforilar la posición D3 del anillo de inositol de los fosfoinosítidos, generando fosfolípidos que se han relacionado con diversas funciones celulares como la diferenciación, la homeostasis de la glucosa, la proliferación, la supervivencia, la quimiotaxis o el tráfico intracelular (Cantley, 2002; Vanhaesebroeck, 2001). Estas kinasas lipídicas están controladas por distintos tipos de receptores de membrana, incluyendo a receptores tirosina kinasa (RTKs) y receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Murga, 2000). Las más estudiadas pertenecen a la clase I. La subclase IA está formada por una subunidad catalítica p110 que aparece en conjunto con una subunidad reguladora p85, de las que se ha demostrado que median las señales de tirosina kinasas y Ras, aunque también se ha descrito que la isoforma p110 β puede ser activada por GPCRs a través de la liberación de dímeros $G\beta\gamma$ (Murga, 2000). La subclase IB de PI3Ks está formada por la subunidad catalítica p110 γ asociada a la subunidad reguladora p101, y se ha demostrado que media las señales de GPCRs y Ras. Se ha demostrado que los GPCRs activan a la PI3K γ a través de su interacción directa con complejos $G\beta\gamma$ (Brock, 2003). Los resultados presentados en este trabajo, indican que la TSH puede activar la vía de PI3K/Akt a través de dímeros $G\beta\gamma$ y que en células tiroideas, esta ruta de señalización interfiere con la inducción de la expresión de NIS mediada por cAMP. Como medida de la actividad PI3K, se determinaron los niveles de la forma

fosforilada en el residuo Ser473 de PKB/Akt, un efector de la PI3K. El modelo actual indica que los PIP3 generados mediante la activación de la PI3K, dirigen a Akt a la membrana, a la que se asocia exponiendo los residuos de Thr308 y Ser473, que serán fosforilados por PDK1 (Alessi, 1997) y por el complejo mTOR-Rictor (Sarbasov, 2005) respectivamente. Queda por determinar si los dímeros $G\beta\gamma$ promueven la activación de mTOR, o simplemente facilitan su actuación al dirigir a Akt a la membrana mediante la activación de la PI3K.

La PI3K desempeña una función crítica en el control de la proliferación celular tiroidea (Cass, 1999; Medina, 2000b). Se ha demostrado que esta vía es activada por diversos factores de crecimiento (Kimura, 2001), y la inhibición de la PI3K provoca la parada de células tiroideas en Go/G1 (Cass, 1999; Medina, 2000b). Dependiendo del tipo celular, se han descrito resultados contradictorios con respecto a la activación de la vía PI3K/Akt en respuesta a TSH (Kimura, 2001). Se ha sugerido que la activación de esta vía por TSH, podría ser debida a una contaminación de factores de crecimiento presentes en la preparación de la TSH bovina, procedente de extractos hipofisarios. Aquí demostramos que la fosforilación de Akt es inducida de manera dependiente de PI3K por una TSH humana recombinante, y por tanto libre de posibles factores de crecimiento. Además la inducción de la fosforilación de Akt por TSH fue bloqueada cuando las células se incubaron con un anticuerpo dirigido contra el TSHR (datos no mostrados). Teniendo en cuenta este conjunto de datos, podemos afirmar que la TSH activa la vía de la PI3K en células tiroideas de rata. La fosforilación de Akt es observada de 10 a 15 minutos después del tratamiento con TSH, alcanzando su efecto máximo a los 30-60 minutos. A tiempos más cortos apenas se observan cambios apreciables en el estado de fosforilación de Akt bajo nuestras condiciones experimentales, que son considerablemente distintas a las empleadas por Lou *et al.* (Lou, 2002). Estos autores observaron una disminución en la fosforilación de Akt tras el tratamiento con TSH, sin embargo en dicho trabajo las células fueron cultivadas en presencia de insulina, que es un potente activador de la vía de la PI3K. En dicho trabajo las células se mantuvieron en ausencia de suero y TSH durante 16h, frente a los 2 a 3 días de nuestros experimentos que aseguran una eliminación adecuada de los niveles de p-Akt. En nuestros ensayos por lo tanto, la inducción de la fosforilación de Akt se debe únicamente a la acción de la TSH. Esta activación no parece ser mediada mayoritariamente por la vía de la PKA o del cAMP, ya que ni la inhibición de PKA, mediante el tratamiento previo con H89, ni el bloqueo de la señal del cAMP, mediante el uso del compuesto Rp-cAMP, un análogo competidor del cAMP, impedían la fosforilación de Akt inducida por TSH. Sin embargo, el tratamiento con forskolina también inducía la fosforilación de Akt dependiente de PI3K, si bien a niveles inferiores a los inducidos por TSH. En vista de estos resultados, no se puede descartar la existencia de una cascada de señalización formada por cAMP/PKA/PI3K en células PCC13, como fue demostrado en células FRTL-5 (De Gregorio, 2007), otra línea celular tiroidea de rata. Sin embargo, ésta no parece ser la única vía de señalización que induce

la activación de PI3K en respuesta a TSH. No cabe duda de que tanto la PKA como la PI3K cumplen funciones cruciales en la regulación de la proliferación y diferenciación celular tiroidea, y los efectos contradictorios que se han descrito en cuanto a la acción de la PKA sobre la actividad de la PI3K, no hacen más que reflejar la gran complejidad de las rutas de señalización y de los procesos que están bajo el control de estas kinasas. Serán necesarios estudios adicionales para aclarar si esta compleja regulación es debida a la activación de diferentes isoformas de ambas enzimas. Nuestros resultados describen una nueva ruta de señalización que promueve la activación de la vía de la PI3K en respuesta a TSH, mediada por dímeros $G\beta\gamma$ y con independencia de la vía del cAMP. Esta nueva ruta de señalización está implicada en el control de la diferenciación tiroidea y por lo tanto de su función.

Para profundizar en el mecanismo de la inhibición de la expresión de NIS llevado a cabo por complejos $G\beta\gamma$, se analizaron los niveles de Pax8 y su capacidad de unión al promotor de *NIS*. Pax8 es el factor de transcripción más importante en la regulación de la expresión de *NIS*. Se ha demostrado que la unión de Pax8 al promotor de *NIS* es necesaria para la inducción de su expresión en respuesta a TSH/cAMP (Ohno, 1999). En este estudio demostramos que la unión de Pax8 al promotor de *NIS* inducida por TSH, aumenta cuando la señal $G\beta\gamma$ es inhibida mediante la expresión de CD8- β ARK. Además el bloqueo de la señal $G\beta\gamma$ no afecta a la capacidad de unión de Pax8 inducida por forskolina, resultado que está en consonancia con los datos obtenidos cuando se analizó la actividad del promotor de *NIS*. Los complejos DNA/Pax8 formados tras la estimulación con TSH, también aumentaron en células tratadas con el inhibidor de PI3K, lo que indicaba que las señales que llevaban a la activación de esta vía, disminuían la cantidad de complejos Pax8/promotor de *NIS*. Podemos por tanto concluir que la liberación de dímeros $G\beta\gamma$ inducida por TSH, activa la vía de la PI3K y reprime la transcripción de *NIS* debido a la disminución de la unión de Pax8 a su promotor. El mecanismo que controla la unión de este factor de transcripción al promotor de *NIS* aún no se ha definido claramente, aunque se sabe que la TSH, vía cAMP, promueve tanto su expresión como su unión al promotor de *NIS* (Mascia, 2002). Pax8 es una fosfoproteína cuyo estado de fosforilación y su localización nuclear, no parecen depender de la vía del cAMP (Van Renterghem, 1996). En otro trabajo se ha sugerido que la capacidad activadora de Pax8 depende de la subunidad catalítica de PKA, implicando a una hipotética molécula diana de PKA, que interaccionaría con el dominio de activación de Pax8 (Poleev, 1997). En lo que respecta a la regulación de la actividad de Pax8 por otras kinasas, tales como la PI3K, los únicos datos disponibles son los que se aportan en este trabajo. Es posible que, en lo que concierne al efecto de la PI3K, suceda algo similar a lo descrito para la vía del cAMP/PKA, ya que el estado de fosforilación de Pax8 también parece ser independiente de la vía de la PI3K (datos no mostrados). De hecho, resultados preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la inhibición de la unión de Pax8 al promotor de *NIS* mediada por PI3K/Akt, es provoca-

da por la interacción de Pax8 con el factor de transcripción de la familia “forkhead” FoxO1, que es un efector de la ruta de IGF-1/PI3K/Akt (Garcia, 2004). En los experimentos de localización subcelular presentados en este trabajo, se observa que Pax8 es excluido del núcleo en células que expresan dímeros Gβ1γ2, y este efecto se pierde parcialmente en presencia del inhibidor de PI3K. Aunque esta observación debe ser estudiada en detalle, surge la hipótesis de que FoxO1 esté implicado en la exclusión nuclear de Pax8, ya que se ha descrito que FoxO1 es excluido del núcleo tras su fosforilación mediada por la PI3K (Huang, 2007).

En vista de los resultados presentados en este trabajo, proponemos un modelo (Fig. 46) en el que, a la inducción de la expresión de NIS ejercida por la vía de TSH/cAMP, se opone una ruta de señalización mediada por los complejos Gβγ liberados tras la unión de la TSH a su receptor, que activan la vía de la PI3K por un mecanismo independiente de cAMP.

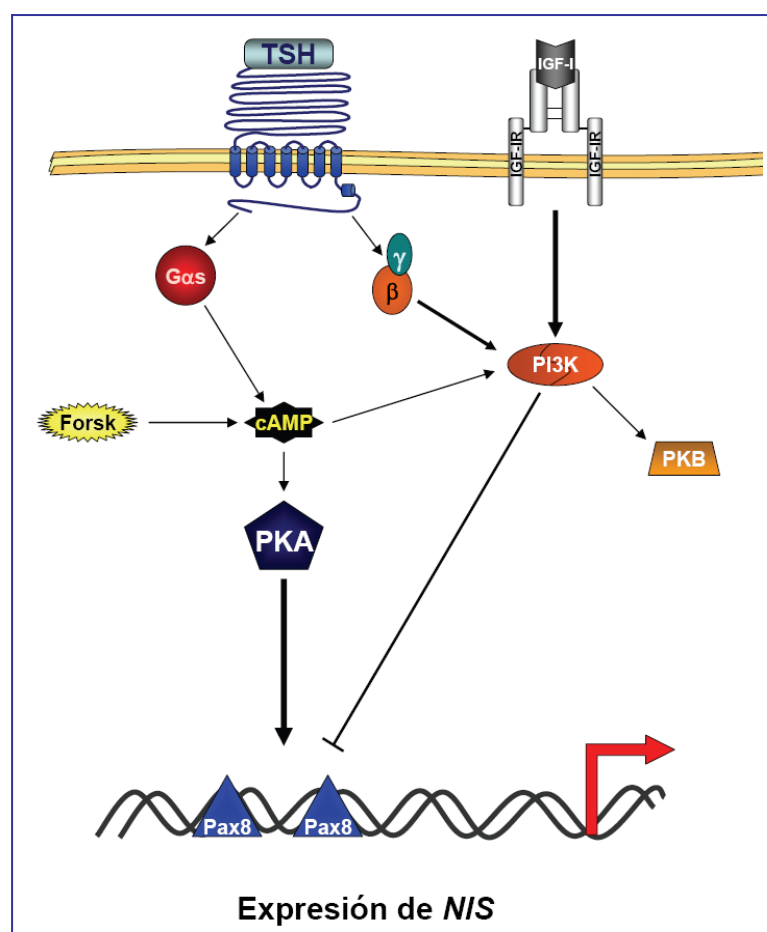


Fig. 46. Modelo de la regulación de la expresión de NIS. La expresión de NIS inducida por TSH está mediada por la vía del cAMP en células tiroideas. La vía de la PI3K puede ser activada por varios estímulos, en este trabajo describimos su activación mediada por Gβγ, que se opone a la inducción de NIS inducida por cAMP, impidiendo la unión de Pax8 al promotor de NIS..

La represión de la expresión de NIS por los dímeros $G\beta\gamma$ tiene lugar a nivel transcripcional, ya que la señalización desencadenada por $G\beta\gamma$ reduce la capacidad de unión de Pax8 al promotor de NIS e induce la exclusión de Pax8 del núcleo. Estos resultados demuestran un papel funcional de los dímeros $G\beta\gamma$ en la diferenciación celular tiroidea. Serán necesarios nuevos estudios para aclarar el mecanismo responsable de la inhibición de unión de Pax8 al promotor de NIS, y de su exclusión nuclear. Por otro lado, distintas rutas de señalización convergen en la activación de la PI3K en células tiroideas (resumidas en la Fig. 46), lo que sugiere la implicación de diferentes isoformas de PI3K en la mediación de estas señales. En una primera aproximación experimental para abordar este tema, observamos que los inmunoprecipitados de la subunidad catalítica de la $PI3K\alpha$ procedentes de células estimuladas con TSH, presentaban un aumento en su actividad kinasa, que no fue observado en los inmunoprecipitados de células tratadas con forskolina. Estos resultados preliminares indican que la TSH promueve la activación de la $PI3K\alpha$ de manera independiente de cAMP, sugiriendo la participación de complejos $G\beta\gamma$. Sin embargo, ni la TSH ni la forskolina promovían aumentos en la actividad kinasa asociada a inmunoprecipitados de la subunidad catalítica de la $PI3K\beta$. Futuros estudios se centrarán en la identificación de las isoformas de PI3K que median las señales del cAMP, de $G\beta\gamma$ o de receptores con actividad tirosina kinasa en células tiroideas.

El significado de la regulación dual de la transcripción de NIS por TSH, que es al mismo tiempo activada vía $G\alpha_s$ /cAMP/PKA y reprimida a través de $G\beta\gamma$ /PI3K/Akt, es una cuestión interesante. Es generalmente aceptado que la TSH induce múltiples mecanismos de autorregulación negativa a través de diferentes rutas de señalización, que actúan a diferentes niveles para contrarrestar su inducción de la proliferación, como método de protección frente al proceso de tumorigénesis. En este sentido se ha observado que los aumentos de los niveles de cAMP promueven la activación de fosfodiesterasas que degradan los excesos de cAMP generados, Gs es inhibida por la acción de RGS2, CREB es inhibido por CREM y se activan GRKs que inhiben a los receptores (van Staveren, 2006). La inducción de estas vías de retroalimentación negativa, es complementada con la inducción de otras proteínas implicadas en la inhibición de la proliferación (DUSP2, RGS16, PTP4A1, JUNB, IGF1BP) (van Staveren, 2006). También se ha descrito una regulación negativa ejercida por la TSH sobre la expresión de su receptor (Shimura, 1994). La captación de yoduro llevada a cabo por NIS es el factor limitante para la biosíntesis de las hormonas tiroideas. La TSH es el regulador principal de esta captación, controlando a NIS tanto a nivel transcripcional (Ohno, 1999) como a nivel post-transcripcional (Riedel, 2001). El otro regulador principal de la acumulación del yoduro, es el mismo yoduro, que ejerce un mecanismo autorregulador que protege al tiroides frente a altas concentraciones de este ión (efecto Wolff-Chaikoff) (Wolff, 1949). De igual modo, las acciones opuestas de la TSH sobre la expresión de NIS (estimulación vía cAMP e inhibición inducida por $G\beta\gamma$), pue-

den ser interpretadas como un mecanismo autorregulador que mantiene un nivel determinado de expresión de NIS y por tanto una tasa concreta de captación de yoduro.

Gracias a su capacidad a la hora de captar radioyodo, NIS ha sido utilizado extensamente como herramienta para el diagnóstico y la terapia de eliminación de tejido tiroideo hiperfuncionante, así como de tumores tiroideos diferenciados que mantienen la expresión y funcionalidad de NIS. De este modo numerosos estudios se han centrado en promover su expresión endógena en tumores tiroideos no diferenciados, o ectópica en tumores de otros tejidos, y en dirigir su correcta localización a la membrana, donde la proteína es funcional. Este trabajo contribuye a la caracterización de los procesos que controlan la expresión y actividad de NIS, así como de los factores de transcripción y vías de señalización implicados, siendo por tanto de gran importancia para el entendimiento de la fisiología tiroidea y de la terapia tumoral en general. Basándonos en nuestro estudio, sería posible mejorar la eficacia de las terapias con radioyodo, aumentando la expresión de NIS mediante la inclusión de un inhibidor de la PI3K junto con la hrTSH. Además el inhibidor de PI3K ya es considerado un agente quimioterapéutico atractivo para el tratamiento del cáncer avanzado de tiroides. Cabe resaltar que los niveles de tiroglobulina en suero son utilizados para monitorizar el estado de los pacientes tratados con radioyodo, por lo que es importante que el tratamiento no afecte a los niveles de esta proteína. Como hemos descrito en este trabajo la inhibición de la vía $G\beta\gamma/PI3K$ no tiene efecto sobre los niveles de la tiroglobulina, por lo que la implementación de inhibidores de esta vía en el tratamiento de los pacientes con tumores tiroideos podría resultar especialmente apropiada.

2. Función de DARPP-32 en la diferenciación celular tiroidea

En la segunda parte de este trabajo nos hemos centrado en el estudio de DARPP-32, una molécula bifuncional cuya expresión se describió inicialmente en neuronas dopaminoceptivas, donde su función ha sido ampliamente estudiada. Su importancia en estas neuronas se pone de manifiesto por el hecho de que más de 10 rutas de señalización diferentes convergen sobre esta molécula. En cerebro, se ha demostrado que DARPP-32 media los efectos, entre otras moléculas, de la dopamina, la cocaína, la serotonina, los opiáceos, la fluoxetina (Prozac) y la cafeína (Svenningsson, 2005). En este trabajo se describe por primera vez la expresión de DARPP-32 en tejido tiroideo, y se presentan distintas evidencias que demuestran que DARPP-32 es esencial para el mantenimiento de la diferenciación celular tiroidea.

Las células tiroideas mantenidas en un estado no diferenciado, mediante su cultivo en un medio carente de TSH e insulina y con suero al 0,2% (4H), poseen niveles muy reducidos de DARPP-32, que son incrementados por el tratamiento con TSH y/o IGF-1, del mismo modo que los marcadores de la diferenciación celular tiroidea. La inducción de la diferenciación tiroidea por TSH e IGF-1 ha sido ampliamente estudiada (Kogai, 1997; Mascia, 2002; Ohno, 1999; Santisteban, 1987; Shimura, 1994), sin embargo esta es la primera demostración de la expresión y regulación de DARPP-32 en células tiroideas. Otra prueba que relaciona a DARPP-32 con el proceso de diferenciación, es la fuerte correlación encontrada entre el nivel de expresión de DARPP-32 y el grado de diferenciación celular. La expresión de DARPP-32 desaparecía o estaba fuertemente reducida en diversas líneas celulares tiroideas no diferenciadas. El silenciamiento de la expresión de DARPP-32 en células tiroideas diferenciadas, mediante el uso de técnicas de interferencia de RNA, provocó una fuerte disminución en la expresión de los factores de transcripción Pax8 y TTF-1, y la pérdida de expresión de los marcadores de la diferenciación tiroidea Tg y NIS. Por el contrario, la expresión exógena de DARPP-32 en células transformadas con el oncogén *H-Ras*, que presentan niveles apenas detectables de la proteína, permitió la activación de los promotores de la *Tg* y *TPO*, cuya expresión se encuentra silenciada en estas células (Francis-Lang, 1992b).

TSH e IGF-1 cooperan para promover la proliferación y diferenciación de la célula epitelial tiroidea (Kimura, 2001; Medina, 2000a). Aquí demostramos que tanto TSH como IGF-1 inducen una fuerte acumulación de DARPP-32, así como su fosforilación en el residuo de Thr34, lo que determina su actuación como un potente inhibidor de la fosfatasa PP1. La inhibición de esta fosfatasa permitiría mantener el estado fosforilado activo de los efectores de la PKA.

En cuanto a la proliferación de las células tiroideas, ésta no parece estar controlada por los niveles de DARPP-32. No se observó ningún efecto aparente sobre la proliferación de células diferenciadas en las que se eliminó la expresión de la proteína, ni en células transformadas con *H-Ras* en

las que DARPP-32 fue sobreexpresada (datos no mostrados). Además, tanto en células tiroideas tumorales o transformadas con Ras, que presentan una elevada tasa de proliferación, como en células cultivadas en medio 4H, que están en un estado quiescente, los niveles de DARPP-32 eran muy bajos o indetectables. Sin embargo, dada la importancia que parece tener DARPP-32 mediando las señales de TSH e IGF-1, las señales proliferativas de ambos estímulos podrían estar potencialmente mediadas por esta proteína. Será necesario realizar un estudio más detallado para determinar la posible contribución de DARPP-32 a la proliferación de las células tiroideas.

El proceso de transformación a menudo se caracteriza por la pérdida de la diferenciación celular. En consonancia células tiroideas transformadas con *Ras* o células provenientes de un tumor tiroideo humano, presentan una pérdida de expresión de los marcadores de diferenciación tales como Tg o NIS (Francis-Lang, 1992b; Velasco, 1998). Los resultados presentados en este trabajo indican que DARPP-32 también desaparece o disminuye drásticamente en estas células y podría representar un marcador eficaz de la progresión tumoral de células tiroideas. Por el contrario, en carcinomas gástricos (El-Rifai, 2002) y en algunos adenocarcinomas comunes, DARPP-32 aparece sobreexpresada (Beckler, 2003). Además en carcinomas gástricos se ha detectado la expresión de una isoforma trunca de la proteína, que pierde el dominio de fosforilación relacionado con la inhibición de la PP1, pero no el relacionado con la inhibición de la PKA (Belkhiri, 2008). En estas células la expresión de DARPP-32 parece proporcionar una ventaja antiapoptótica a las células tumorales. También se ha descrito la expresión de DARPP-32 en células de mama, que sin embargo se pierde en células transformadas, lo que se ha relacionado con un aumento de su capacidad de migración (Hansen, 2006). Así, dependiendo del tipo celular, la señalización que converge sobre DARPP-32 afecta a procesos como la apoptosis, supervivencia, migración o diferenciación, y por tanto y dependiendo de los procesos que regule, su presencia será ventajosa o contraproducente para el desarrollo de las células tumorales de un tejido determinado. Serán necesarias nuevas investigaciones para delinear la función potencial de DARPP-32 en la progresión tumoral.

En cerebro la mayoría de proteínas que controlan la función de DARPP-32, lo hacen a través de su fosforilación (Hemmings, 1984; Lindskog, 2002; Nishi, 2002; Nishi, 1999; Nishi, 1997), aunque también se ha descrito la regulación del nivel de proteína por algunos estímulos como el BDNF (Ivkovic, 1997) o los estrógenos (Stroppolo, 2004). En tejido tiroideo el control de la proteína parece ser realizado tanto a nivel de su expresión, como de su fosforilación en el residuo de Thr34. La inhibición de las vías de la PKA o de la PI3K bloqueó la acumulación de DARPP-32 inducida por TSH, indicando que ambas vías participan en la expresión de la proteína. La inhibición de la PI3K eliminaba completamente los niveles de DARPP-32 inducidos por IGF-1, así como los niveles basales de la proteína. Esto podría indicar que la activación de la PI3K, además de aumentar la expresión

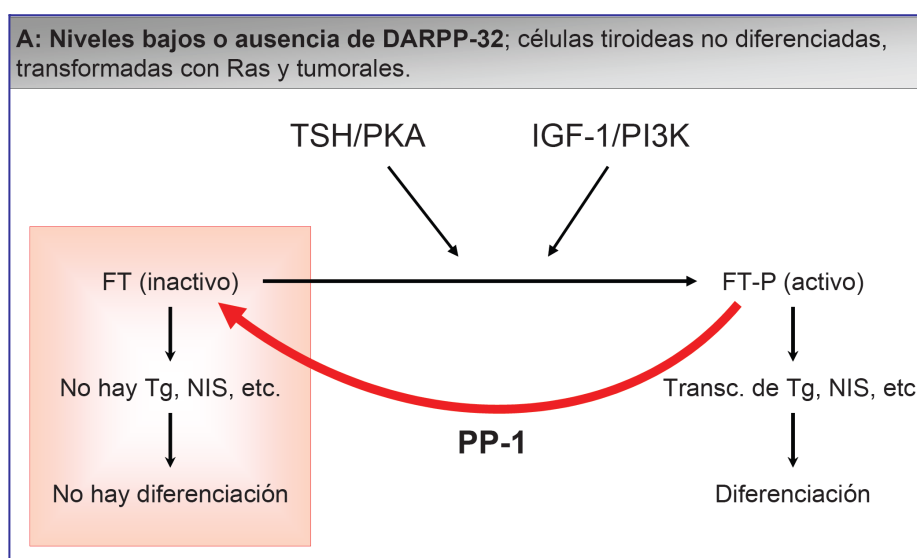
de DARPP-32, podría estar implicada en la estabilización del mRNA o de la proteína. En neuronas, el BDNF también promueve la expresión de DARPP-32 de manera dependiente de PI3K (Stroppolo, 2001). Esta ruta de señalización activada por receptores tirosina kinasa podría ser un mecanismo general para regular la expresión de DARPP-32 en distintos tipos celulares. TSH e IGF-1, los dos estímulos más importantes que controlan la diferenciación celular tiroidea afectan positivamente tanto a la expresión como a la fosforilación de la proteína, aunque el tratamiento conjunto no tiene un efecto aditivo sobre los niveles de DARPP-32. Datos preliminares de nuestro laboratorio indican que el suero, probablemente mediante la activación de la vía de las MAPK, elimina la expresión basal de DARPP-32. En presencia de suero, TSH e IGF-1 son incapaces de inducir la acumulación de la proteína, que sólo es posible cuando ambos factores son añadidos en conjunto. Esta compleja regulación de la expresión de DARPP-32, en respuesta a distintos factores y a través de distintas vías de señalización, refleja la complicada regulación descrita en tejido cerebral, y se necesitarán estudios adicionales para definir la aportación de estas vías de señalización y los mecanismos implicados en el control de la expresión de la proteína.

De este modo, DARPP-32 se podría definir como un tercer mensajero de la acción de hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores. En el tiroides, la función de DARPP-32 parece estar relacionada con la integración de las señales diferenciadoras de TSH e IGF-1. Tanto la ausencia de TSH e IGF-1 como la eliminación de la expresión de DARPP-32, provocan la pérdida de expresión de los marcadores de la diferenciación tiroidea Tg y NIS. La yodación de residuos de Tyr de la molécula de Tg es esencial para el desarrollo de la función tiroidea, y depende del aporte de yoduro dependiente de NIS. Los niveles de NIS en membrana están directamente relacionados con la captación de yoduro, tanto en células tiroideas como en células de otros tejidos (Dwyer, 2005; Wapnir, 2004). La eliminación de la expresión de DARPP-32 en células tiroideas provocó una disminución en los niveles totales de NIS, cuya expresión en membrana disminuía en paralelo (datos no mostrados).

La expresión de los marcadores de la diferenciación tiroidea depende de la actividad de un conjunto de factores de transcripción, tanto específicos de tejido como de expresión ubicua (Damante, 2001), siendo TTF-1, FoxE1 y Pax8 los más importantes. Se ha demostrado que Pax8 es necesario para la diferenciación de las células epiteliales tiroideas (Mansouri, 1998), y nuestros resultados sugieren que DARPP-32 es necesaria para mantener la expresión y por tanto la actividad de Pax8. Nuestros resultados también han probado que la expresión de DARPP-32 es necesaria para mantener la expresión de TTF-1. La expresión de este factor de transcripción está reducida en células tiroideas transformadas con el oncogén *H-Ras*, y presenta además un patrón de fosforilación alterado, que se ha relacionado con su pérdida de actividad (Velasco, 1998). La reintroducción de

DARPP-32 dotaría a estas células de la capacidad de inhibir a la fosfatasa PP1, lo que podría ser necesario para una correcta fosforilación y activación de TTF-1 y de Pax8. De este modo, la reexpresión de DARPP-32 en células tiroideas transformadas con *H-Ras*, aumentó la actividad de los promotores de *Tg* y de *TPO* inducida por TSH. Nuestros datos relacionando a DARPP-32 con el proceso de diferenciación, podrían ser particularmente relevantes en adipocitos, donde se ha descrito que los niveles de DARPP-32 aumentan drásticamente cuando células 3T3-L1 se diferencian dando lugar a adipocitos (Brady, 1997).

Nuestros resultados sugieren un modelo (Fig. 48B) en el que la inhibición de PP1 ejercida por DARPP-32, permitiría el mantenimiento de la expresión y activación de los factores de transcripción tiroideos inducida por TSH e IGF-1. Estos factores, a través de las vías de PKA y de PI3K, promueven la expresión y la activación de factores de transcripción (Pax8, TTF-1), que inducirían la transcripción de los marcadores finales de la diferenciación (Tg, NIS). La acumulación de DARPP-32 inducida por TSH/IGF-1, y su fosforilación en el residuo de Thr34, permitirían su actuación como inhibidor de la fosfatasa PP1, promoviendo el mantenimiento de niveles elevados de factores de transcripción fosforilados, prolongando los eventos iniciales de fosforilación y permitiendo la acumulación de los marcadores de la diferenciación tiroidea. Por el contrario en células que han perdido la expresión de DARPP-32 (Fig. 48A), PP1 actuaría sin freno, revirtiendo las fosforilaciones de TTF-1 y Pax8 inducidas por TSH e IGF-1. Por lo tanto cualquier efecto de la señalización de TSH e IGF-1 sería transitorio e insuficiente para proporcionar una expresión y activación adecuada de los factores de transcripción Pax8 y TTF-1, impidiendo el desarrollo de una diferenciación celular completa.



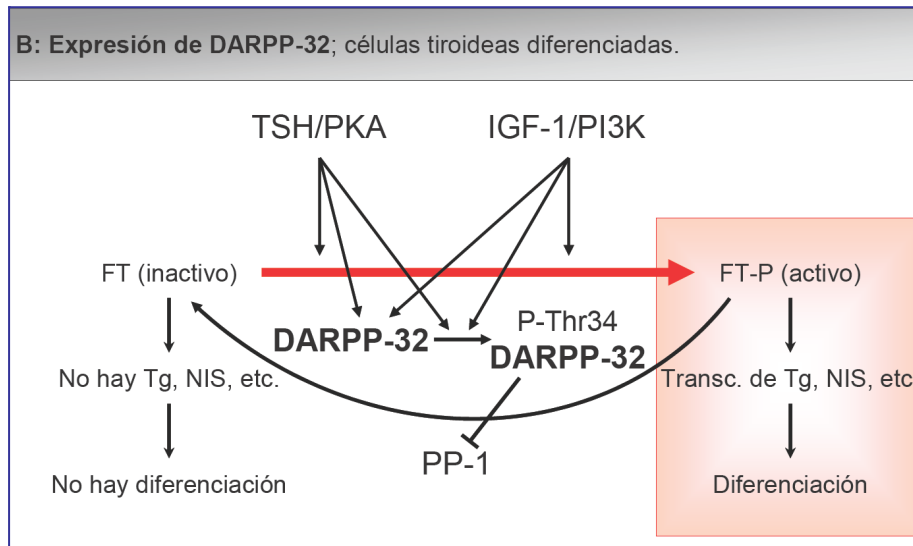


Fig. 48. Esquema de la regulación de la expresión de DARPP-32 y de su acción sobre la diferenciación de células epiteliales tiroideas diferenciadas (B) y no diferenciadas (A). Las flechas indican activación y las líneas truncadas inhibición. FT: Factor de transcripción.

Bibliografia

Bibliografía

- al-Alawi, N., Rose, D. W., Buckmaster, C., Ahn, N., Rapp, U., Meinkoth, J. y Feramisco, J. R. "Thyrotropin-induced mitogenesis is Ras dependent but appears to bypass the Raf-dependent cytoplasmic kinase cascade." *Mol Cell Biol* 15(3): 1162-8 (1995).
- Albert, K. A., Hemmings, H. C., Jr., Adamo, A. I., Potkin, S. G., Akbarian, S., Sandman, C. A., Cotman, C. W., Bunney, W. E., Jr. y Greengard, P. "Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia." *Arch Gen Psychiatry* 59(8): 705-12 (2002).
- Alberts, A. S., Arias, J., Hagiwara, M., Montminy, M. R. y Feramisco, J. R. "Recombinant cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylated on Ser-133 is transcriptionally active upon its introduction into fibroblast nuclei." *J Biol Chem* 269(10): 7623-30 (1994).
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. y Cohen, P. "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." *Curr Biol* 7(4): 261-9 (1997).
- Alnemri, E. S. "Hidden powers of the mitochondria." *Nat Cell Biol* 1(2): E40-2 (1999).
- Allgeier, A., Laugwitz, K. L., Van Sande, J., Schultz, G. y Dumont, J. E. "Multiple G-protein coupling of the dog thyrotropin receptor." *Mol Cell Endocrinol* 127(1): 81-90 (1997).
- Ambesi-Impiombato, F. S., Parks, L. A. y Coon, H. G. "Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(6): 3455-9 (1980).
- Amr, S., Menezes-Ferreira, M., Shimohigashi, Y., Chen, H. C., Nisula, B. y Weintraub, B. D. "Activities of deglycosylated thyrotropin at the thyroid membrane receptor-adenylate cyclase system." *J Endocrinol Invest* 8(6): 537-41 (1985).
- Andrews, N. C. y Faller, D. V. "A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells." *Nucleic Acids Res* 19(9): 2499 (1991).
- Arcaro, A., Volinia, S., Zvelebil, M. J., Stein, R., Watton, S. J., Layton, M. J., Gout, I., Ahmadi, K., Downward, J. y Waterfield, M. D. "Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity." *J Biol Chem* 273(49): 33082-90 (1998).
- Avidor-Reiss, T., Nevo, I., Levy, R., Pfeuffer, T. y Vogel, Z. "Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma." *J Biol Chem* 271(35): 21309-15 (1996).

- Aza-Blanc, P., Di Lauro, R. y Santisteban, P. "Identification of a cis-regulatory element and a thyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity." *Mol Endocrinol* 7(10): 1297-306 (1993).
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. y Valentinis, B. "The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1332(3): F105-26 (1997).
- Bayewitch, M. L., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Pfeuffer, T., Nevo, I., Simonds, W. F. y Vogel, Z. "Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits." *Faseb J* 12(11): 1019-25 (1998a).
- Bayewitch, M. L., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Pfeuffer, T., Nevo, I., Simonds, W. F. y Vogel, Z. "Differential modulation of adenylyl cyclases I and II by various G beta subunits." *J Biol Chem* 273(4): 2273-6 (1998b).
- Beckler, A., Moskaluk, C. A., Zaika, A., Hampton, G. M., Powell, S. M., Frierson, H. F., Jr. y El-Rifai, W. "Overexpression of the 32-kilodalton dopamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein in common adenocarcinomas." *Cancer* 98(7): 1547-51 (2003).
- Belkhiri, A., Dar, A. A., Zaika, A., Kelley, M. y El-Rifai, W. "t-Darpp promotes cancer cell survival by up-regulation of Bcl2 through Akt-dependent mechanism." *Cancer Res* 68(2): 395-403 (2008).
- Bernier-Valentin, F., Kostrouch, Z., Rabilloud, R. y Rousset, B. "Analysis of the thyroglobulin internalization process using in vitro reconstituted thyroid follicles: evidence for a coated vesicle-dependent endocytic pathway." *Endocrinology* 129(4): 2194-201 (1991).
- Berstein, G., Blank, J. L., Jhon, D. Y., Exton, J. H., Rhee, S. G. y Ross, E. M. "Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator." *Cell* 70(3): 411-8 (1992).
- Bibb, J. A., Snyder, G. L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A. A., Tsai, L. H., Kwon, Y. T., Girault, J. A., Czernik, A. J., Huganir, R. L., Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C. y Greengard, P. "Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons." *Nature* 402(6762): 669-71 (1999).
- Bottomley, M. J., Salim, K. y Panayotou, G. "Phospholipid-binding protein domains." *Biochim Biophys Acta* 1436(1-2): 165-83 (1998).
- Bourne, H. R. "How receptors talk to trimeric G proteins." *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 134-42 (1997).

- Bradford, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54 (1976).
- Brady, M. J., Nairn, A. C. y Saltiel, A. R. "The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action." *J Biol Chem* 272(47): 29698-703 (1997).
- Brock, C., Schaefer, M., Reusch, H. P., Czupalla, C., Michalke, M., Spicher, K., Schultz, G. y Nurnberg, B. "Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma." *J Cell Biol* 160(1): 89-99 (2003).
- Brown, R. A., Domin, J., Arcaro, A., Waterfield, M. D. y Shepherd, P. R. "Insulin activates the alpha isoform of class II phosphoinositide 3-kinase." *J Biol Chem* 274(21): 14529-32 (1999).
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. y Greenberg, M. E. "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* 96(6): 857-68 (1999).
- Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N. y Johnson, G. L. "G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly." *J Biol Chem* 270(42): 24631-4 (1995).
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R. y Hamm, H. E. "Insights into G protein structure, function, and regulation." *Endocr Rev* 24(6): 765-81 (2003).
- Cantley, L. C. "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* 296(5573): 1655-7 (2002).
- Cass, L. A. y Meinkoth, J. L. "Ras signaling through PI3K confers hormone-independent proliferation that is compatible with differentiation." *Oncogene* 19(7): 924-32 (2000).
- Cass, L. A., Summers, S. A., Prendergast, G. V., Backer, J. M., Birnbaum, M. J. y Meinkoth, J. L. "Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation." *Mol Cell Biol* 19(9): 5882-91 (1999).
- Coleman, D. E., Berghuis, A. M., Lee, E., Linder, M. E., Gilman, A. G. y Sprang, S. R. "Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis." *Science* 265(5177): 1405-12 (1994).
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F. y Gutkind, J. S. "Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits." *Nature* 369(6479): 418-20 (1994).

- Crespo, P., Cachero, T. G., Xu, N. y Gutkind, J. S. "Dual effect of beta-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. Evidence for a beta gamma-dependent activation and a G alpha s-cAMP-mediated inhibition." *J Biol Chem* 270(42): 25259-65 (1995).
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. y Hemmings, B. A. "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* 378(6559): 785-9 (1995).
- Chen, C. A. y Okayama, H. "Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA." *Biotechniques* 6(7): 632-8 (1988).
- Cho, J. Y., Xing, S., Liu, X., Buckwalter, T. L., Hwa, L., Sferra, T. J., Chiu, I. M. y Jhiang, S. M. "Expression and activity of human Na⁺/I⁻ symporter in human glioma cells by adenovirus-mediated gene delivery." *Gene Ther* 7(9): 740-9 (2000).
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9 (1987).
- Chuang, T. T., Pompili, E., Paolucci, L., Sallese, M., De Gioia, L., Salmona, M. y De Blasi, A. "Identification of a short sequence highly divergent between beta-adrenergic-receptor kinases 1 and 2 that determines the affinity of binding to betagamma subunits of heterotrimeric guanine-nucleotide-binding regulatory proteins." *Eur J Biochem* 245(3): 533-40 (1997).
- Dai, G., Levy, O. y Carrasco, N. "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter." *Nature* 379(6564): 458-60 (1996).
- Damante, G., Tell, G. y Di Lauro, R. "A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 307-56 (2001).
- Damante, G., Chazenbalk, G., Russo, D., Rapoport, B., Foti, D. y Filetti, S. "Thyrotropin regulation of thyroid peroxidase messenger ribonucleic acid levels in cultured rat thyroid cells: evidence for the involvement of a nontranscriptional mechanism." *Endocrinology* 124(6): 2889-94 (1989).
- Davies, T., Marians, R. y Latif, R. "The TSH receptor reveals itself." *J Clin Invest* 110(2): 161-4 (2002).
- De Deken, X., Wang, D., Dumont, J. E. y Miot, F. "Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system." *Exp Cell Res* 273(2): 187-96 (2002).

- De Gregorio, G., Coppa, A., Cosentino, C., Ucci, S., Messina, S., Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Di Pardo, A., Avvedimento, E. V. y Porcellini, A. "The p85 regulatory subunit of PI3K mediates TSH-cAMP-PKA growth and survival signals." *Oncogene* 26(14): 2039-47 (2007).
- De Leo, R., Miccadei, S., Zammarchi, E. y Civitareale, D. "Role for p300 in Pax 8 induction of thyroperoxidase gene expression." *J Biol Chem* 275(44): 34100-5 (2000).
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R. H., Wittinghofer, A. y Bos, J. L. "Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs." *J Biol Chem* 275(27): 20829-36 (2000).
- Degroot, L. J. y Niepomniszcze, H. "Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects." *Metabolism* 26(6): 665-718 (1977).
- Dhanasekaran, N. y Dermott, J. M. "Signaling by the G12 class of G proteins." *Cell Signal* 8(4): 235-45 (1996).
- Di Palma, T., Nitsch, R., Mascia, A., Nitsch, L., Di Lauro, R. y Zannini, M. "The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription." *J Biol Chem* 278(5): 3395-402 (2003).
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. y Roeder, R. G. "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei." *Nucleic Acids Res* 11(5): 1475-89 (1983).
- Dingli, D., Diaz, R. M., Bergert, E. R., O'Connor, M. K., Morris, J. C. y Russell, S. J. "Genetically targeted radiotherapy for multiple myeloma." *Blood* 102(2): 489-96 (2003).
- Downes, G. B. y Gautam, N. "The G protein subunit gene families." *Genomics* 62(3): 544-52 (1999).
- Downward, J. "How BAD phosphorylation is good for survival." *Nat Cell Biol* 1(2): E33-5 (1999).
- Dremier, S., Vandeput, F., Zwartkruis, F. J., Bos, J. L., Dumont, J. E. y Maenhaut, C. "Activation of the small G protein Rap1 in dog thyroid cells by both cAMP-dependent and -independent pathways." *Biochem Biophys Res Commun* 267(1): 7-11 (2000).
- Dremier, S., Pohl, V., Poteet-Smith, C., Roger, P. P., Corbin, J., Doskeland, S. O., Dumont, J. E. y Maenhaut, C. "Activation of cyclic AMP-dependent kinase is required but may not be sufficient to mimic cyclic AMP-dependent DNA synthesis and thyroglobulin expression in dog thyroid cells." *Mol Cell Biol* 17(11): 6717-26 (1997).

- Dremier, S., Coulonval, K., Perpete, S., Vandeput, F., Fortemaision, N., Van Keymeulen, A., Deleu, S., Ledent, C., Clement, S., Schurmans, S., Dumont, J. E., Lamy, F., Roger, P. P. y Maenhaut, C. "The role of cyclic AMP and its effect on protein kinase A in the mitogenic action of thyrotropin on the thyroid cell." *Ann N Y Acad Sci* 968: 106-21 (2002).
- Dumont, J. E. "The action of thyrotropin on thyroid metabolism." *Vitam Horm* 29: 287-412 (1971).
- Dwyer, R. M., Bergert, E. R., O'Connor M, K., Gendler, S. J. y Morris, J. C. "In vivo radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1-driven expression of the sodium iodide symporter." *Clin Cancer Res* 11(4): 1483-9 (2005).
- El-Rifai, W., Smith, M. F., Jr., Li, G., Beckler, A., Carl, V. S., Montgomery, E., Knuutila, S., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Jr. y Powell, S. M. "Gastric cancers overexpress DARPP-32 and a novel isoform, t-DARPP." *Cancer Res* 62(14): 4061-4 (2002).
- Fabbro, D., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Belfiore, A., Di Lauro, R. y Damante, G. "Expression of thyroid-specific transcription factors TTF-1 and PAX-8 in human thyroid neoplasms." *Cancer Res* 54(17): 4744-9 (1994).
- Fagin, J. A., Matsuo, K., Karmakar, A., Chen, D. L., Tang, S. H. y Koeffler, H. P. "High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas." *J Clin Invest* 91(1): 179-84 (1993).
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T. A. y Bourne, H. R. "cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells." *J Biol Chem* 269(11): 7851-4 (1994).
- Federman, A. D., Conklin, B. R., Schrader, K. A., Reed, R. R. y Bourne, H. R. "Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits." *Nature* 356(6365): 159-61 (1992).
- Fernandez, M., Sanchez-Franco, F., Palacios, N., Sanchez, I. y Cacicedo, L. "IGF-I and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate cAMP-response element-binding protein (CREB)-dependent transcription via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in pituitary cells: requirement of Rap1." *J Mol Endocrinol* 34(3): 699-712 (2005).
- Field, J. B., Ealey, P. A., Marshall, N. J. y Cockcroft, S. "Thyroid-stimulating hormone stimulates increases in inositol phosphates as well as cyclic AMP in the FRTL-5 rat thyroid cell line." *Biochem J* 247(3): 519-24 (1987).

- Figler, R. A., Graber, S. G., Lindorfer, M. A., Yasuda, H., Linden, J. y Garrison, J. C. "Reconstitution of recombinant bovine A1 adenosine receptors in Sf9 cell membranes with recombinant G proteins of defined composition." *Mol Pharmacol* 50(6): 1587-95 (1996).
- Fong, H. K., Yoshimoto, K. K., Eversole-Cire, P. y Simon, M. I. "Identification of a GTP-binding protein alpha subunit that lacks an apparent ADP-ribosylation site for pertussis toxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(9): 3066-70 (1988).
- Foubister, V. "Do all paths lead to DARPP-32?" *Drug Discov Today* 7(21): 1068-70 (2002).
- Francis-Lang, H., Price, M., Polycarpou-Schwarz, M. y Di Lauro, R. "Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression." *Mol Cell Biol* 12(2): 576-88 (1992a).
- Francis-Lang, H., Zannini, M., De Felice, M., Berlingieri, M. T., Fusco, A. y Di Lauro, R. "Multiple mechanisms of interference between transformation and differentiation in thyroid cells." *Mol Cell Biol* 12(12): 5793-800 (1992b).
- Fry, M. J. "Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play?" *Breast Cancer Res* 3(5): 304-12 (2001).
- Fukuhara, S., Chikumi, H. y Gutkind, J. S. "RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho?" *Oncogene* 20(13): 1661-8 (2001).
- Fusco, A., Berlingieri, M. T., Di Fiore, P. P., Portella, G., Grieco, M. y Vecchio, G. "One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes." *Mol Cell Biol* 7(9): 3365-70 (1987).
- Gagnon, A. W., Manning, D. R., Catani, L., Gewirtz, A., Poncz, M. y Brass, L. F. "Identification of Gz alpha as a pertussis toxin-insensitive G protein in human platelets and megakaryocytes." *Blood* 78(5): 1247-53 (1991).
- Garcia, B. y Santisteban, P. "PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression." *Mol Endocrinol* 16(2): 342-52 (2002).
- Garcia, B., Costamagna, E. y Santisteban, P. "The transcription factor FoxO1 interacts with Pax8 and inhibits NIS transcription." Program of the 30th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Istanbul, Turkey: p23 (abstract O41) (2004).
- Garritsen, A. y Simonds, W. F. "Multiple domains of G protein beta confer subunit specificity in beta gamma interaction." *J Biol Chem* 269(39): 24418-23 (1994).

- Gerard, A. C., Many, M. C., Daumerie, C., Costagliola, S., Miot, F., DeVijlder, J. J., Colin, I. M. y Denef, J. F. "Structural changes in the angiofollicular units between active and hypofunctioning follicles align with differences in the epithelial expression of newly discovered proteins involved in iodine transport and organification." *J Clin Endocrinol Metab* 87(3): 1291-9 (2002).
- Glineur, C. y Locht, C. "Importance of ADP-ribosylation in the morphological changes of PC12 cells induced by cholera toxin." *Infect Immun* 62(10): 4176-85 (1994).
- Greengard, P., Allen, P. B. y Nairn, A. C. "Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade." *Neuron* 23(3): 435-47 (1999).
- Gross, B., Misrahi, M., Sar, S. y Milgrom, E. "Composite structure of the human thyrotropin receptor gene." *Biochem Biophys Res Commun* 177(2): 679-87 (1991).
- Guazzi, S., Price, M., De Felice, M., Damante, G., Mattei, M. G. y Di Lauro, R. "Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity." *Embo J* 9(11): 3631-9 (1990).
- Halpain, S., Girault, J. A. y Greengard, P. "Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices." *Nature* 343(6256): 369-72 (1990).
- Hamm, H. E. "The many faces of G protein signaling." *J Biol Chem* 273(2): 669-72 (1998).
- Hansen, C., Greengard, P., Nairn, A. C., Andersson, T. y Vogel, W. F. "Phosphorylation of DARPP-32 regulates breast cancer cell migration downstream of the receptor tyrosine kinase DDR1." *Exp Cell Res* 312(20): 4011-8 (2006).
- Hemmings, H. C., Jr., Greengard, P., Tung, H. Y. y Cohen, P. "DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1." *Nature* 310(5977): 503-5 (1984).
- Herman, P. K., Stack, J. H. y Emr, S. D. "An essential role for a protein and lipid kinase complex in secretory protein sorting." *Trends Cell Biol* 2(12): 363-8 (1992).
- Hochbaum, D., Hong, K., Barila, G., Ribeiro-Neto, F. y Altschuler, D. L. "Epac, in Synergy with cAMP-dependent Protein Kinase (PKA), Is Required for cAMP-mediated Mitogenesis." *J Biol Chem* 283(8): 4464-8 (2008).
- Hooley, R., Yu, C. Y., Symons, M. y Barber, D. L. "G alpha 13 stimulates Na⁺-H⁺ exchange through distinct Cdc42-dependent and RhoA-dependent pathways." *J Biol Chem* 271(11): 6152-8 (1996).

- Hu, Z. W., Shi, X. Y., Lin, R. Z. y Hoffman, B. B. "Alpha1 adrenergic receptors activate phosphatidylinositol 3-kinase in human vascular smooth muscle cells. Role in mitogenesis." *J Biol Chem* 271(15): 8977-82 (1996).
- Huang, H. y Tindall, D. J. "Dynamic FoxO transcription factors." *J Cell Sci* 120(Pt 15): 2479-87 (2007).
- Hwang, J. I., Choi, S., Fraser, I. D., Chang, M. S. y Simon, M. I. "Silencing the expression of multiple Gbeta-subunits eliminates signaling mediated by all four families of G proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(27): 9493-8 (2005).
- Iacovelli, L., Capobianco, L., Salvatore, L., Sallese, M., D'Ancona, G. M. y De Blasi, A. "Thyrotropin activates mitogen-activated protein kinase pathway in FRTL-5 by a cAMP-dependent protein kinase A-independent mechanism." *Mol Pharmacol* 60(5): 924-33 (2001).
- Ivkovic, S., Polonskaia, O., Farinas, I. y Ehrlich, M. E. "Brain-derived neurotrophic factor regulates maturation of the DARPP-32 phenotype in striatal medium spiny neurons: studies in vivo and in vitro." *Neuroscience* 79(2): 509-16 (1997).
- Jiang, Y., Ma, W., Wan, Y., Kozasa, T., Hattori, S. y Huang, X. Y. "The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain." *Nature* 395(6704): 808-13 (1998).
- Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D. y Weiss, A. "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase." *Curr Biol* 9(11): 601-4 (1999).
- Kato, Y., Ozaki, N., Yamada, T., Miura, Y. y Oiso, Y. "H-89 potentiates adipogenesis in 3T3-L1 cells by activating insulin signaling independently of protein kinase A." *Life Sci* 80(5): 476-83 (2007).
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J. y Waterfield, M. D. "Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 615-75 (2001).
- Kerchner, K. R., Clay, R. L., McCleery, G., Watson, N., McIntire, W. E., Myung, C. S. y Garrison, J. C. "Differential sensitivity of phosphatidylinositol 3-kinase p110gamma to isoforms of G protein betagamma dimers." *J Biol Chem* 279(43): 44554-62 (2004).
- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J. E. y Roger, P. P. "Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models." *Endocr Rev* 22(5): 631-56 (2001).

- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. y Clark, B. F. "The GTP binding motif: variations on a theme." *Faseb J* 10(12): 1347-68 (1996).
- Koch, W. J., Hawes, B. E., Inglese, J., Luttrell, L. M. y Lefkowitz, R. J. "Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling." *J Biol Chem* 269(8): 6193-7 (1994).
- Kogai, T., Endo, T., Saito, T., Miyazaki, A., Kawaguchi, A. y Onaya, T. "Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells." *Endocrinology* 138(6): 2227-32 (1997).
- Kops, G. J., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L. y Burgering, B. M. "Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B." *Nature* 398 (6728): 630-4 (1999).
- Kowalski-Chauvel, A., Pradayrol, L., Vaysse, N. y Seva, C. "Gastrin stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with Grb2 and the phosphatidylinositol 3-kinase." *J Biol Chem* 271(42): 26356-61 (1996).
- Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M. J., Sternweis, P. M., Singer, W. D., Gilman, A. G., Bollag, G. y Sternweis, P. C. "p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13." *Science* 280(5372): 2109-11 (1998).
- Krugmann, S., Hawkins, P. T., Pryer, N. y Braselmann, S. "Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits." *J Biol Chem* 274(24): 17152-8 (1999).
- Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S., Fukui, Y., Uii, M., Hazeki, O. y Katada, T. "Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide." *J Biol Chem* 272(39): 24252-6 (1997).
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E. y Sigler, P. B. "The 2.0 A crystal structure of a heterotrimeric G protein." *Nature* 379(6563): 311-9 (1996).
- Lapthorn, A. J., Harris, D. C., Littlejohn, A., Lustbader, J. W., Canfield, R. E., Machin, K. J., Morgan, F. J. y Isaacs, N. W. "Crystal structure of human chorionic gonadotropin." *Nature* 369(6480): 455-61 (1994).

- Laugwitz, K. L., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., Van Sande, J., Dumont, J. E. y Schultz, G. "The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 116-20 (1996).
- Laurberg, P. "Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion." *Metabolism* 33(4): 379-92 (1984).
- Laurent, E., Mockel, J., Van Sande, J., Graff, I. y Dumont, J. E. "Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid." *Mol Cell Endocrinol* 52(3): 273-8 (1987).
- Lazzaro, D., Price, M., de Felice, M. y Di Lauro, R. "The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain." *Development* 113(4): 1093-104 (1991).
- Li, X., Lu, S., Miyagi, E., Katoh, R. y Kawaoi, A. "Thyrotropin prevents apoptosis by promoting cell adhesion and cell cycle progression in FRTL-5 cells." *Endocrinology* 140(12): 5962-70 (1999).
- Lindorfer, M. A., Myung, C. S., Savino, Y., Yasuda, H., Khazan, R. y Garrison, J. C. "Differential activity of the G protein beta5 gamma2 subunit at receptors and effectors." *J Biol Chem* 273(51): 34429-36 (1998).
- Lindskog, M., Svenningsson, P., Pozzi, L., Kim, Y., Fienberg, A. A., Bibb, J. A., Fredholm, B. B., Nairn, A. C., Greengard, P. y Fisone, G. "Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine." *Nature* 418(6899): 774-8 (2002).
- Lissitzky, S., Fayet, G., Giraud, A., Verrier, B. y Torresani, J. "Thyrotrophin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine-thyroid cells. 1. Mechanism of action of thyrotrophin and metabolic properties." *Eur J Biochem* 24(1): 88-99 (1971).
- Liu, F. C. y Graybiel, A. M. "Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum." *Neuron* 17(6): 1133-44 (1996).
- Locht, C. y Antoine, R. "A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit." *Biochimie* 77(5): 333-40 (1995).
- Lou, L., Urbani, J., Ribeiro-Neto, F. y Altschuler, D. L. "cAMP inhibition of Akt is mediated by activated and phosphorylated Rap1b." *J Biol Chem* 277(36): 32799-806 (2002).
- Macchia, P. E., Lapi, P., Krude, H., Pirro, M. T., Missero, C., Chiovato, L., Souabni, A., Baserga, M., Tassi, V., Pinchera, A., Fenzi, G., Gruters, A., Busslinger, M. y Di Lauro, R. "PAX8

- mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis." *Nat Genet* 19(1): 83-6 (1998).
- MacKenzie, S. J., Baillie, G. S., McPhee, I., MacKenzie, C., Seamons, R., McSorley, T., Millen, J., Beard, M. B., van Heeke, G. y Houslay, M. D. "Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1)." *Br J Pharmacol* 136(3): 421-33 (2002).
- Maier, U., Babich, A. y Nurnberg, B. "Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma." *J Biol Chem* 274(41): 29311-7 (1999).
- Mandell, R. B., Mandell, L. Z. y Link, C. J., Jr. "Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene." *Cancer Res* 59(3): 661-8 (1999).
- Mansouri, A., Chowdhury, K. y Gruss, P. "Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function." *Nat Genet* 19(1): 87-90 (1998).
- Marians, R. C., Ng, L., Blair, H. C., Unger, P., Graves, P. N. y Davies, T. F. "Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15776-81 (2002).
- Mascia, A., Nitsch, L., Di Lauro, R. y Zannini, M. "Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells." *J Endocrinol* 172(1): 163-76 (2002).
- Mascia, A., De Felice, M., Lipardi, C., Gentile, R., Cali, G., Zannini, M., Di Lauro, R. y Nitsch, L. "Transfection of TTF-1 gene induces thyroglobulin gene expression in undifferentiated FRT cells." *Biochim Biophys Acta* 1354(2): 171-81 (1997).
- Matovcik, L. M., Hemmings, H. C., Jr. y Kinder, B. K. "DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, M(r) 32,000) is a membrane protein in the bovine parathyroid." *FEBS Lett* 364(1): 67-74 (1995).
- Medina, D. L. y Santisteban, P. "Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems." *Eur J Endocrinol* 143(2): 161-78 (2000a).
- Medina, D. L., Toro, M. J. y Santisteban, P. "Somatostatin interferes with thyrotropin-induced G1-S transition mediated by cAMP-dependent protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Involvement of RhoA and cyclin E x cyclin-dependent kinase 2 complexes." *J Biol Chem* 275(20): 15549-56 (2000b).

- Meng, J., Glick, J. L., Polakis, P. y Casey, P. J. "Functional interaction between G α (z) and Rap1GAP suggests a novel form of cellular cross-talk." *J Biol Chem* 274(51): 36663-9 (1999).
- Muca, C. y Vallar, L. "Expression of mutationally activated G α s stimulates growth and differentiation of thyroid FRTL5 cells." *Oncogene* 9(12): 3647-53 (1994).
- Murga, C., Fukuhara, S. y Gutkind, J. S. "A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt." *J Biol Chem* 275(16): 12069-73 (2000).
- Murga, C., Laguinje, L., Wetzker, R., Cuadrado, A. y Gutkind, J. S. "Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma." *J Biol Chem* 273(30): 19080-5 (1998).
- Nave, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R. y Shepherd, P. R. "Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation." *Biochem J* 344 Pt 2: 427-31 (1999).
- Nguyen, L. Q., Kopp, P., Martinson, F., Stanfield, K., Roth, S. I. y Jameson, J. L. "A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function." *Mol Endocrinol* 14(9): 1448-61 (2000).
- Nishi, A., Snyder, G. L. y Greengard, P. "Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine." *J Neurosci* 17(21): 8147-55 (1997).
- Nishi, A., Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Fisone, G., Aperia, A., Nairn, A. C. y Greengard, P. "Requirement for DARPP-32 in mediating effect of dopamine D2 receptor activation." *Eur J Neurosci* 11(7): 2589-92 (1999).
- Nishi, A., Bibb, J. A., Matsuyama, S., Hamada, M., Higashi, H., Nairn, A. C. y Greengard, P. "Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A." *J Neurochem* 81(4): 832-41 (2002).
- Nitsch, L., Tramontano, D., Ambesi-Impiombato, F. S., Quarto, N. y Bonatti, S. "Morphological and functional polarity of an epithelial thyroid cell line." *Eur J Cell Biol* 38(1): 57-66 (1985).
- Niu, J., Vaiskunaite, R., Suzuki, N., Kozasa, T., Carr, D. W., Dulin, N. y Voyno-Yasenetskaya, T. A. "Interaction of heterotrimeric G13 protein with an A-kinase-anchoring protein 110

- (AKAP110) mediates cAMP-independent PKA activation." *Curr Biol* 11(21): 1686-90 (2001).
- Ohmori, M., Endo, T., Harii, N. y Onaya, T. "A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin-induced up-regulation of Na⁺/I⁻ symporter gene expression." *Mol Endocrinol* 12(5): 727-36 (1998).
- Ohno, M., Zannini, M., Levy, O., Carrasco, N. y di Lauro, R. "The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription." *Mol Cell Biol* 19(3): 2051-60 (1999).
- Olianas, M. C. y Onali, P. "Mediation by G protein betagamma subunits of the opioid stimulation of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb." *Biochem Pharmacol* 57(6): 649-52 (1999).
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. y Donner, D. B. "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." *Nature* 401(6748): 82-5 (1999).
- Paroder, V., Spencer, S. R., Paroder, M., Arango, D., Schwartz, S., Jr., Mariadason, J. M., Augenlicht, L. H., Eskandari, S. y 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* 103(19): 7270-5 (2006).
- Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R. y Zannini, M. "Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(24): 13144-9 (2000).
- Pham, N., Cheglakov, I., Koch, C. A., de Hoog, C. L., Moran, M. F. y Rotin, D. "The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP." *Curr Biol* 10(9): 555-8 (2000).
- Pierce, J. G. y Parsons, T. F. "Glycoprotein hormones: structure and function." *Annu Rev Biochem* 50: 465-95 (1981).
- Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." *Science* 257(5074): 1264-7 (1992).
- Plachov, D., Chowdhury, K., Walther, C., Simon, D., Guenet, J. L. y Gruss, P. "Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland." *Development* 110(2): 643-51 (1990).

- Plonk, S. G., Park, S. K. y Exton, J. H. "The alpha-subunit of the heterotrimeric G protein G13 activates a phospholipase D isozyme by a pathway requiring Rho family GTPases." *J Biol Chem* 273(9): 4823-6 (1998).
- Pohlenz, J., Dumitrescu, A., Zundel, D., Martine, U., Schonberger, W., Koo, E., Weiss, R. E., Cohen, R. N., Kimura, S. y Refetoff, S. "Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice." *J Clin Invest* 109(4): 469-73 (2002).
- Poleev, A., Okladnova, O., Musti, A. M., Schneider, S., Royer-Pokora, B. y Plachov, D. "Determination of functional domains of the human transcription factor PAX8 responsible for its nuclear localization and transactivating potential." *Eur J Biochem* 247(3): 860-9 (1997).
- Pollak, M. N., Schernhammer, E. S. y Hankinson, S. E. "Insulin-like growth factors and neoplasia." *Nat Rev Cancer* 4(7): 505-18 (2004).
- Prior, I. A. y Clague, M. J. "Localization of a class II phosphatidylinositol 3-kinase, PI3KC2alpha, to clathrin-coated vesicles." *Mol Cell Biol Res Commun* 1(2): 162-6 (1999).
- Ptasznik, A., Prossnitz, E. R., Yoshikawa, D., Smrcka, A., Traynor-Kaplan, A. E. y Bokoch, G. M. "A tyrosine kinase signaling pathway accounts for the majority of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate formation in chemoattractant-stimulated human neutrophils." *J Biol Chem* 271(41): 25204-7 (1996).
- Radhika, V., Onesime, D., Ha, J. H. y Dhanasekaran, N. "Galpha13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1." *J Biol Chem* 279(47): 49406-13 (2004).
- Rameh, L. E. y Cantley, L. C. "The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function." *J Biol Chem* 274(13): 8347-50 (1999).
- Rhee, S. G. "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C." *Annu Rev Biochem* 70: 281-312 (2001).
- Rhee, S. G. y Bae, Y. S. "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes." *J Biol Chem* 272(24): 15045-8 (1997).
- Riedel, C., Levy, O. y Carrasco, N. "Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin." *J Biol Chem* 276(24): 21458-63 (2001).
- Romashkova, J. A. y Makarov, S. S. "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling." *Nature* 401(6748): 86-90 (1999).

- Ross, E. M. y Wilkie, T. M. "GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins." *Annu Rev Biochem* 69: 795-827 (2000).
- Santisteban, P., Kohn, L. D. y Di Lauro, R. "Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells." *J Biol Chem* 262(9): 4048-52 (1987).
- Santisteban, P., Acebron, A., Polycarpou-Schwarz, M. y Di Lauro, R. "Insulin and insulin-like growth factor I regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter." *Mol Endocrinol* 6(8): 1310-7 (1992).
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. y Sabatini, D. M. "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* 307(5712): 1098-101 (2005).
- Saward, L. y Zahradka, P. "Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* 81(2): 249-57 (1997).
- Schiffmann, S. N., Lledo, P. M. y Vincent, J. D. "Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A." *J Physiol* 483 (Pt 1): 95-107 (1995).
- Schmidt, C. J., Thomas, T. C., Levine, M. A. y Neer, E. J. "Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions." *J Biol Chem* 267(20): 13807-10 (1992).
- Schneider, T., Igelmund, P. y Hescheler, J. "G protein interaction with K⁺ and Ca²⁺ channels." *Trends Pharmacol Sci* 18(1): 8-11 (1997).
- Scholich, K., Mullenix, J. B., Wittpoth, C., Poppleton, H. M., Pierre, S. C., Lindorfer, M. A., Garrison, J. C. y Patel, T. B. "Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase." *Science* 283(5406): 1328-31 (1999).
- Selbie, L. A., King, N. V., Dickenson, J. M. y Hill, S. J. "Role of G-protein beta gamma subunits in the augmentation of P2Y₂ (P2U)receptor-stimulated responses by neuropeptide Y Y1 Gi/o-coupled receptors." *Biochem J* 328 (Pt 1): 153-8 (1997).
- Shimura, H., Okajima, F., Ikuyama, S., Shimura, Y., Kimura, S., Saji, M. y Kohn, L. D. "Thyroid-specific expression and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate autoregulation of the thyrotropin receptor gene involves thyroid transcription factor-1." *Mol Endocrinol* 8(8): 1049-69 (1994).

- Skalhegg, B. S. y Tasken, K. "Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA." *Front Biosci* 5: D678-93 (2000).
- Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Huganir, R. L. y Greengard, P. "A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor." *J Neurosci* 18 (24): 10297-303 (1998).
- Spitzweg, C., Joba, W., Eisenmenger, W. y Heufelder, A. E. "Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa." *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1746-51 (1998).
- Spitzweg, C., Zhang, S., Bergert, E. R., Castro, M. R., McIver, B., Heufelder, A. E., Tindall, D. J., Young, C. Y. y Morris, J. C. "Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines." *Cancer Res* 59 (9): 2136-41 (1999).
- Spring, D. J. y Neer, E. J. "A 14-amino acid region of the G protein gamma subunit is sufficient to confer selectivity of gamma binding to the beta subunit." *J Biol Chem* 269(36): 22882-6 (1994).
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B. y et al. "Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase." *Science* 269(5224): 690-3 (1995).
- Stroppolo, A., Guinea, B., Tian, C., Sommer, J. y Ehrlich, M. E. "Role of phosphatidylinositide 3-kinase in brain-derived neurotrophic factor-induced DARPP-32 expression in medium size spiny neurons in vitro." *J Neurochem* 79(5): 1027-32 (2001).
- Stroppolo, A., Tian, C., Guinea, B., Olm, V., Sheffield, R., Sommer, J. y Ehrlich, M. E. "17beta-Estradiol promotes striatal medium size spiny neuronal maturation in vitro." *Neuroendocrinology* 79(5): 259-67 (2004).
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W. y Gilman, A. G. "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 461-80 (1996).
- Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C. y Greengard, P. "Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons." *Neuron* 14(2): 385-97 (1995).

- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H. y Kozasa, T. "G α 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(2): 733-8 (2003).
- Svenningsson, P., Nairn, A. C. y Greengard, P. "DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse." *Aaps J* 7(2): E353-60 (2005).
- Svenningsson, P., Tzavara, E. T., Witkin, J. M., Fienberg, A. A., Nomikos, G. G. y Greengard, P. "Involvement of striatal and extrastriatal DARPP-32 in biochemical and behavioral effects of fluoxetine (Prozac)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 3182-7 (2002).
- Svenningsson, P., Fienberg, A. A., Allen, P. B., Moine, C. L., Lindskog, M., Fisone, G., Greengard, P. y Fredholm, B. B. "Dopamine D(1) receptor-induced gene transcription is modulated by DARPP-32." *J Neurochem* 75(1): 248-57 (2000).
- Szkudlinski, M. W., Fremont, V., Ronin, C. y Weintraub, B. D. "Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships." *Physiol Rev* 82(2): 473-502 (2002).
- Tamir, H., Fawzi, A. B., Tamir, A., Evans, T. y Northup, J. K. "G-protein beta gamma forms: identity of beta and diversity of gamma subunits." *Biochemistry* 30(16): 3929-36 (1991).
- Thomason, P. A., James, S. R., Casey, P. J. y Downes, C. P. "A G-protein beta gamma-subunit-responsive phosphoinositide 3-kinase activity in human platelet cytosol." *J Biol Chem* 269(24): 16525-8 (1994).
- Tramontano, D., Moses, A. C. y Ingbar, S. H. "The role of adenosine 3',5'-monophosphate in the regulation of receptors for thyrotropin and insulin-like growth factor I in the FRTL5 rat thyroid follicular cell." *Endocrinology* 122(1): 133-6 (1988).
- Trischitta, V., Damante, G., Foti, D. y Filetti, S. "Insulin binding and biological activities in the FRTL-5 rat thyroid cell line." *Metabolism* 36(4): 379-83 (1987).
- Turner, S. J., Domin, J., Waterfield, M. D., Ward, S. G. y Westwick, J. "The CC chemokine monocyte chemoattractant peptide-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2 α ." *J Biol Chem* 273(40): 25987-95 (1998).
- Ueda, N., Iniguez-Lluhi, J. A., Lee, E., Smrcka, A. V., Robishaw, J. D. y Gilman, A. G. "G protein beta gamma subunits. Simplified purification and properties of novel isoforms." *J Biol Chem* 269(6): 4388-95 (1994).

- Vaiskunaite, R., Adarichev, V., Furthmayr, H., Kozasa, T., Gudkov, A. y Voyno-Yasenetskaya, T. A. "Conformational activation of radixin by G13 protein alpha subunit." *J Biol Chem* 275 (34): 26206-12 (2000).
- Van Renterghem, P., Vassart, G. y Christophe, D. "Pax 8 expression in primary cultured dog thyrocyte is increased by cyclic AMP." *Biochim Biophys Acta* 1307(1): 97-103 (1996).
- van Staveren, W. C., Solis, D. W., Delys, L., Venet, D., Cappello, M., Andry, G., Dumont, J. E., Libert, F., Detours, V. y Maenhaut, C. "Gene expression in human thyrocytes and autonomous adenomas reveals suppression of negative feedbacks in tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(2): 413-8 (2006).
- Vanhaesebroeck, B. y Alessi, D. R. "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." *Biochem J* 346 Pt 3: 561-76 (2000).
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J. y Waterfield, M. D. "Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids." *Annu Rev Biochem* 70: 535-602 (2001).
- Vanvooren, V., Allgeier, A., Cosson, E., Van Sande, J., Defer, N., Pirlot, M., Hanoune, J. y Dumont, J. E. "Expression of multiple adenylyl cyclase isoforms in human and dog thyroid." *Mol Cell Endocrinol* 170(1-2): 185-96 (2000).
- Vassart, G. y Dumont, J. E. "The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth." *Endocr Rev* 13(3): 596-611 (1992).
- Velasco, J. A., Acebron, A., Zannini, M., Martin-Perez, J., Di Lauro, R. y Santisteban, P. "Ha-ras interference with thyroid cell differentiation is associated with a down-regulation of thyroid transcription factor-1 phosphorylation." *Endocrinology* 139(6): 2796-802 (1998).
- Waheed, A. A. y Jones, T. L. "Hsp90 interactions and acylation target the G protein Galpha 12 but not Galpha 13 to lipid rafts." *J Biol Chem* 277(36): 32409-12 (2002).
- Walaas, S. I. y Greengard, P. "DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. I. Regional and cellular distribution in the rat brain." *J Neurosci* 4(1): 84-98 (1984).
- Wang, H. F. y Liu, F. C. "Regulation of multiple dopamine signal transduction molecules by retinoids in the developing striatum." *Neuroscience* 134(1): 97-105 (2005).

- Wapnir, I. L., Goris, M., Yudd, A., Dohan, O., Adelman, D., Nowels, K. y 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* 10(13): 4294-302 (2004).
- Wedegaertner, P. B. "Lipid modifications and membrane targeting of G α ." *Biol Signals Recept* 7(2): 125-35 (1998).
- Wettschureck, N. y Offermanns, S. "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiol Rev* 85(4): 1159-204 (2005).
- Wolff, J., Chaikoff, I. L. y et al. "The temporary nature of the inhibitory action of excess iodine on organic iodine synthesis in the normal thyroid." *Endocrinology* 45(5): 504-13, illust (1949).
- Woloshin, P. I., Walton, K. M., Rehfuss, R. P., Goodman, R. H. y Cone, R. D. "3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated enhancer binding (CREB) activity is required for normal growth and differentiated phenotype in the FRTL5 thyroid follicular cell line." *Mol Endocrinol* 6(10): 1725-33 (1992).
- Wu, D., Katz, A., Lee, C. H. y Simon, M. I. "Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family." *J Biol Chem* 267(36): 25798-802 (1992).
- Xu, X., Croy, J. T., Zeng, W., Zhao, L., Davignon, I., Popov, S., Yu, K., Jiang, H., Offermanns, S., Muallem, S. y Wilkie, T. M. "Promiscuous coupling of receptors to Gq class alpha subunits and effector proteins in pancreatic and submandibular gland cells." *J Biol Chem* 273(42): 27275-9 (1998).
- Yamaguchi, Y., Katoh, H., Mori, K. y Negishi, M. "G α (12) and G α (13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity." *Curr Biol* 12(15): 1353-8 (2002).
- Yap, A. S., Stevenson, B. R., Keast, J. R. y Manley, S. W. "Cadherin-mediated adhesion and apical membrane assembly define distinct steps during thyroid epithelial polarization and lumen formation." *Endocrinology* 136(10): 4672-80 (1995).
- Yasuda, H., Lindorfer, M. A., Woodfork, K. A., Fletcher, J. E. y Garrison, J. C. "Role of the prenyl group on the G protein gamma subunit in coupling trimeric G proteins to A1 adenosine receptors." *J Biol Chem* 271(31): 18588-95 (1996).
- Yi, M., Tong, G. X., Murry, B. y Mendelson, C. R. "Role of CBP/p300 and SRC-1 in transcriptional regulation of the pulmonary surfactant protein-A (SP-A) gene by thyroid transcription factor-1 (TTF-1)." *J Biol Chem* 277(4): 2997-3005 (2002).

- Yoshida, A., Hisatome, I., Taniguchi, S., Sasaki, N., Yamamoto, Y., Miake, J., Fukui, H., Shimizu, H., Okamura, T., Okura, T., Igawa, O., Shigemasa, C., Green, E. D., Kohn, L. D. y Suzuki, K. "Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin." *Endocrinology* 145(9): 4301-8 (2004).
- Yoshimura, M., Ikeda, H. y Tabakoff, B. "mu-Opioid receptors inhibit dopamine-stimulated activity of type V adenylyl cyclase but enhance dopamine-stimulated activity of type VII adenylyl cyclase." *Mol Pharmacol* 50(1): 43-51 (1996).
- Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D. y Di Lauro, R. "Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters." *Mol Cell Biol* 12(9): 4230-41 (1992).
- Zannini, M., Avantaggiato, V., Biffali, E., Arnone, M. I., Sato, K., Pischetola, M., Taylor, B. A., Phillips, S. J., Simeone, A. y Di Lauro, R. "TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation." *Embo J* 16(11): 3185-97 (1997).
- Zarrilli, R., Formisano, S. y Di Jeso, B. "Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells." *Mol Endocrinol* 4(1): 39-45 (1990).
- Zhang, J., Banfic, H., Straforini, F., Tosi, L., Volinia, S. y Rittenhouse, S. E. "A type II phosphoinositide 3-kinase is stimulated via activated integrin in platelets. A source of phosphatidylinositol 3-phosphate." *J Biol Chem* 273(23): 14081-4 (1998).
- Zhang, M. L., Sugawa, H., Kosugi, S. y Mori, T. "Constitutive activation of the thyrotropin receptor by deletion of a portion of the extracellular domain." *Biochem Biophys Res Commun* 211(1): 205-10 (1995).

Anexo

DARPP-32 (Dopamine and 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate-Regulated Neuronal Phosphoprotein) Is Essential for the Maintenance of Thyroid Differentiation

Custodia García-Jiménez, Miguel A. Zaballos, and Pilar Santisteban

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (C.G.-J., M.A.Z., P.S.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28029 Madrid, Spain; and Universidad Rey Juan Carlos (C.G.-J.), Facultad Ciencias de la Salud, 28922 Alcorcón, Madrid Spain

Coordination of events leading to differentiation is mediated by the concerted action of multiple signal transduction pathways. In general, the uncoupling of mechanisms linking differentiation to cell cycle exit is a hallmark of cancer, yet the identity and regulation of molecules integrating signal transduction pathways remains largely unknown. One notable exception is DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein, molecular mass, 32 kDa), a third messenger that integrates multiple signaling pathways in the brain. Thyroid cells represent an excellent model for understanding the coupling of signal transduction pathways leading to both proliferation and differentiation. The cooperative action of IGF-I and TSH together, but not alone, enable thyroid cells to proliferate while maintaining their differentiated state. How signaling downstream from these molecules is integrated is not known. Here we show

that DARPP-32 expression is targeted by TSH and IGF-I in thyrocytes. Significantly, dedifferentiated, tumoral, or Ras-transformed thyrocytes fail to express DARPP-32 whereas short interfering RNA-mediated silencing of DARPP-32 expression in normally differentiated thyroid cells results in loss of differentiation markers such as thyroid transcription factor 1, Pax8, thyroglobulin, and the Na/I symporter. Consistently, DARPP-32 reexpression in ras-transformed cells results in reactivation of the otherwise silent thyroglobulin and thyroperoxidase promoter. Thus, DARPP-32 is critical for the maintenance of thyroid differentiation by TSH and IGF-I, and loss of DARPP-32 expression may be a characteristic of thyroid cancer. Our results also raise the possibility that DARPP-32 may play a similar role in the maintenance of differentiation of a range of other cell types. (*Molecular Endocrinology* 19: 3060–3072, 2005)

CELL DIFFERENTIATION OCCURS as a result of the concerted activation of multiple signaling pathways in response to environmental stimuli. In general, differentiation occurs at the expense of proliferation and, as such, signaling pathways regulating proliferation must be coordinated with those promoting differentiation. Thyroid cells represent an excellent system because the main stimuli governing their function cooperatively promote both growth and differentiation. Differentiated thyroid cells express a number of final differentiation markers such as thyroglobulin (Tg), thyroperoxidase (TPO) and the Na/I symporter (NIS) the expression of

which is governed by combinations of ubiquitous and thyroid-specific transcription factors such as thyroid-specific transcription factor (TTF)1, TTF2, and Pax8 (1). Differentiated thyroid cells in culture are dependent on the presence of TSH and insulin/IGF-I, which cooperate to promote both growth and differentiation (2, 3). Undifferentiated thyrocytes can also be maintained in culture in a medium depleted of serum, TSH, and IGF-I. Although cooperation of both TSH and IGF-I is required for correct thyrocyte function, the molecular mechanisms leading from the TSH and IGF-I membrane receptors to thyroid-specific transcription factors and consequent expression of final differentiation markers are not well understood. TSH binds its G protein-coupled receptor producing an increase in intracellular cAMP, which activates protein kinase A (PKA), and other pathways such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). IGF-I, through its tyrosine kinase receptor, activates both the PI3K and protein kinase C pathways. Additionally, there are indications suggesting that a convergence from both the TSH- and IGF-I signaling pathways might exist in the thyrocyte (4).

Given the importance of IGF-I and TSH signaling for thyroid cell function, a major question concerns

First Published Online July 14, 2005

Abbreviations: DARPP-32, Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, molecular mass 32 kDa; GFP, green fluorescent protein; NIS: Na/I symporter; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKA, protein kinase A; PP1, protein phosphatase 1; siRNA, short interfering RNA; Tg, thyroglobulin; TPO, thyroperoxidase; TSH-R, TSH receptor; TTF1 and TTF2, thyroid-specific transcription factors 1 and 2, respectively.

***Molecular Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.**

the identity of the molecules that play a key role in facilitating their cooperative action. Such mediators are important as messengers of hormone action, as signal integrators, and as therapeutic targets. An example of such “messengers or integrators” is provided by DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein; molecular mass, 32 kDa) a molecule the expression of which was once thought to be restricted to dopaminergic neurons in specific brain areas where it acts as a molecular switch integrating signals from different membrane receptors. At least 10 signaling pathways are known to alter DARPP-32 function in the medium spiny neurons of the striatum (5) where its function and regulation have been well studied. Furthermore, diverse electrophysiological and biochemical alterations, as well as interesting behavioral peculiarities, which characterize DARPP-32 knockout mice, reflecting the importance of the protein (6). Thus, DARPP-32 is the only known molecule capable of alternatively inhibiting either protein phosphatase 1 (PP1) or PKA, both of which play crucial roles in most cell types.

Here we show that DARPP-32 is expressed in thyrocytes, its levels correlate with the degree of differentiation, and its expression is abolished with transformation. Importantly, silencing of DARPP-32 using short interfering RNA (siRNA) results in loss of the thyroid-specific differentiation markers and conversely DARPP-32 reexpression in Ras-transformed cells results in reactivation of the otherwise silent Tg and TPO promoters. Our results identify DARPP-32 as a critical factor for thyroid differentiation promoted by TSH and IGF-I.

RESULTS

DARPP-32 Is Expressed in Thyroid Cells

In the course of examining mRNAs that were differentially expressed between differentiated and undifferentiated thyroid cells, we isolated by RT-PCR a cDNA corresponding to DARPP-32, a protein that alternatively inhibits PP1 or PKA in dopaminergic neurons of specific brain regions. To confirm the unexpected observation that this gene is also expressed in thyroid, we performed Northern blots using total RNA extracted from the thyroid cell line FRTL-5, unrelated Rat1 fibroblasts, and fetal lung tissue using a rat DARPP-32 cDNA as a probe. The results (Fig. 1A) confirmed that DARPP-32 was expressed in the thyroid cell line FRTL-5, but not in unrelated Rat1 fibroblasts or fetal lung tissue. Similar results were observed using the PC Cl3 thyroid cell line (data not shown). To confirm that the gene was expressed in primary thyroid tissue, we made Western blots using a specific anti-DARPP-32 antibody and protein extracts from brain and thyroid tissue. The results confirmed that DARPP-32 is expressed in both thyroid and brain

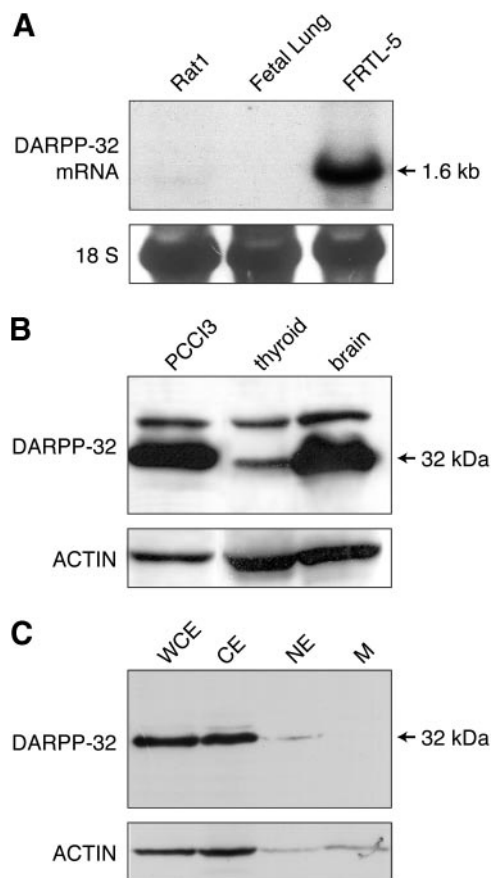


Fig. 1. DARPP-32 Is Expressed in Thyroid Cells and Is Cytoplasmic

A, Northern blot of RNA derived from thyroid cells (FRTL-5), Rat1 fibroblasts, or rat fetal lung tissue (FL) as indicated using a DARPP-32 cDNA probe. B, Western blot of brain, thyroid tissue, and the thyroid cell line PC Cl3 using specific anti-DARPP-32 antibody. C, Western blot of fractionated PC Cl3 thyroid cells using anti-DARPP-32 antibody. WCE, Whole-cell extract; CE, cytoplasmic extract; NE, nuclear extract; M, membrane fraction.

as well as the PC Cl3 thyroid cell line (Fig. 1B). Actin was used as a loading control. The high DARPP-32 expression levels found in cultured cells, as compared with the primary tissue, could be attributed to many reasons. For example, expression in the tissue could be restricted to some cells in certain follicles as reported for other thyroid proteins such as human apical iodide transporter (7) or could be due to natural negative regulators present in the whole animal and absent in the cultured cells.

Although in neurons DARPP-32 is located in the soluble fraction of the cytoplasm, in the parathyroid DARPP-32 was found in the membrane fraction where its target, PP1, is devoted to specific substrates (8). To understand whether in thyroid cells DARPP-32 is restricted to the membrane or soluble fractions, we fractionated cell extracts from the PC Cl3 thyroid cell line. Western blotting (Fig. 1C) re-

vealed that most of the protein was located in the soluble cytoplasmic fraction as in neurons and was absent from the membrane fraction in contrast to parathyroid cells. The small amount observed in the nuclear fraction is due to small amount of cytoplasm associated with the nuclei (see also some actin) when fractionated by the Dignam method. Furthermore, microscopic observation of the cells stained with anti-DARPP-32 antibodies reveals that most of the protein is cytoplasmic (see Fig. 4B) with the background nuclear staining being also found in cells where DARPP-32 is undetectable by Western.

DARPP-32 Expression Correlates with Thyroid Differentiation

In our initial RT-PCR experiments we found DARPP-32 highly expressed in normal, differentiated thyroid cell lines whereas it was absent in the nondifferentiated Ha-Ras and K-Ras-transformed FRTL-5 thyroid cell lines (9), as well as in the undifferentiated human thyroid tumoral cell line (FRO) (10). It was also absent from the undifferentiated thyroid-derived cell line FRT, which manifests the polarized epithelial phenotype but does not express any of the thyroid functional properties (11). Northern blotting using a DARPP-32 probe on total RNA derived from these cell lines confirmed the absence of DARPP-32 mRNA in the nondifferentiated thyroid cell lines (Fig. 2A). The results revealed that DARPP-32 mRNA levels were decreased in parallel with the degree of undifferentiation. Compared with the high levels of DARPP-32 mRNA found in normally growing differentiated FRTL-5 cells, the Ha-ras transformed FRTL-5 cells had barely detectable levels, and DARPP-32 mRNA was undetectable in both the K-ras-transformed FRTL-5 cells (see below) and in the FRT cell line. These results suggested that when differentiation is compromised by transformation, DARPP-32 mRNA expression is silenced. Remarkably, DARPP-32 mRNA is also ab-

sent in the nontransformed, but undifferentiated, FRT thyroid cell line, reinforcing the correlation between lack of DARPP-32 expression and lack of differentiation. In agreement with this, Fig. 2B shows that DARPP-32 protein levels were also undetectable in the FRT, the K-ras/FRTL-5, and the FRO thyroid cell lines and were severely reduced in the Ha-ras-transformed FRTL-5 cells compared with the normal FRTL-5 or PC Cl3 thyroid cells. Recombinant DARPP-32 expressed in bacteria was used as a positive control.

Although lack of differentiation in the tumor-derived FRO and Ras-transformed thyroid cell lines correlates with suppression of DARPP-32 expression, loss of DARPP-32 expression could be a secondary event associated with transformation. Nevertheless, the correlation between DARPP-32 silencing and transformation, together with the fact that the nontransformed but undifferentiated thyroid cell line FRT is devoid of DARPP-32 expression, raised the possibility that DARPP-32 might play a role in thyroid differentiation. To further confirm that DARPP-32 expression correlates with differentiation in nontransformed thyroid cells, DARPP-32 expression was compared between quiescent, undifferentiated PC Cl3 cells cultivated for 8 d in 4H medium and differentiated PC Cl3 cells grown in the presence of TSH and IGF-I in 6H medium. In 4H medium cells are quiescent, proliferation is minimal, and final differentiation markers (such as Tg and NIS) are not expressed, whereas cells proliferating in 6H medium do express final differentiation markers. Total protein extracts from cells cultivated in 4H or 6H medium were subjected to Western blotting and the results are shown in Fig. 2C. Untransformed, quiescent thyroid cells cultivated in 4H medium and not expressing differentiation markers show greatly reduced DARPP-32 protein levels compared with differentiated thyroid cells growing in 6H medium (5- to 8-fold). Thus again, DARPP-32 expression levels correlate with differentiation, suggesting that a pre-

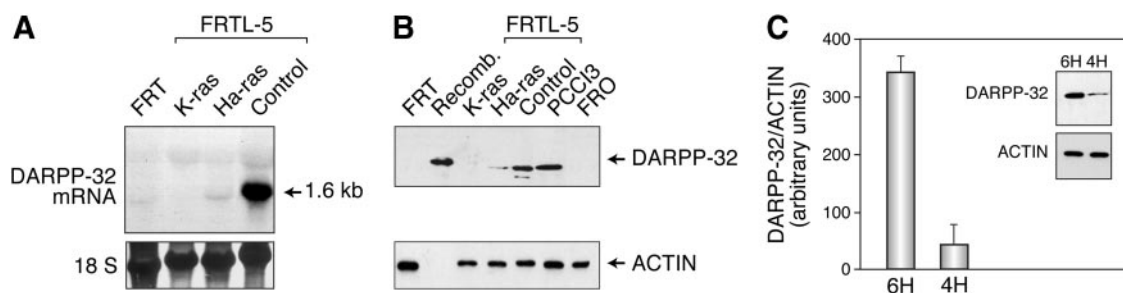


Fig. 2. Thyroid Differentiation Directly Correlates with DARPP-32 Expression

A, Northern blot of RNA derived from undifferentiated (FRT), ras-transformed (K-ras, Ha-ras), or normal differentiated (Control) FRTL-5 thyroid cells. B and C, Western blots of extracts from the indicated cell lines using a specific anti-DARPP-32 antibody. Recombinant bacterially produced DARPP-32 was used as a positive control. C, Untransformed undifferentiated PC Cl3 thyroid cells cultivated in 4H medium show reduced DARPP-32 protein levels as compared with differentiated thyroid cells growing in 6H medium.

cise control of its activity may be required for proper function and differentiation of thyroid cells. The extent of induction of DARPP-32 expression in 6H medium varied between different experiments and reflected differences in the degree of confluence at the onset of starvation in 4H medium (data not shown): slightly higher confluence at the onset of starvation results in leaky expression of differentiation markers, such as NIS, Tg, and DARPP-32, that partially masks the induction by 6H medium. This observation again emphasizes the parallel previously established between DARPP-32 levels and expression of differentiation markers. Furthermore, DARPP-32 mRNA or protein levels in cells cultivated in 4H medium are low but detectable and at least 20 times higher than in Ha-Ras-transformed cells where DARPP-32 is hardly detectable (data not shown).

DARPP-32 Is Required to Maintain Thyroid Cell Differentiation

Our results show that TSH and IGF-I stimulate DARPP-32 expression in thyroid and that DARPP-32 expression strongly correlates with differentiation, raising the possibility that DARPP-32 plays a role in TSH and IGF-I-mediated thyrocyte differentiation. We used siRNA to deplete differentiated thyrocytes of DARPP-32 and asked whether the levels of the differentiation markers were affected. A modified pSuper vector expressing green fluorescent protein (GFP) and either a DARPP-32-specific siRNA (pSGD), or a control luciferase-specific siRNA (pSGL), were transfected into PC Cl3 thyroid cells. Expression of DARPP-32, Tg, and NIS was examined by immunofluorescence (data not shown). The results indicated that DARPP-32 and Tg expression were significantly reduced in the GFP-positive cells transfected with the pSGD vector and unaffected in control cells transfected with the vector pSGL (see confocal photographs in Fig. 4). This was confirmed by Western blotting of total protein extracts of cells transfected with either interference vector as described above using anti-NIS antibodies to monitor differentiation. The results are presented in Fig. 3A. Actin was used as a loading control whereas the expression of GFP reflects the efficacy of transfection. Compared with the levels in the pSGL control-transfected cells, DARPP-32 expression was reduced in pSGD-transfected cells (DARPP-32 silenced) to approximately 30% of the control levels. Importantly, NIS levels in the pSGD (DARPP-32 siRNA)-transfected cells were 20% compared with the control pSGL-transfected cells. Note that any reduction in DARPP-32 expression will only occur in those cells that are transfected and GFP positive. The efficiency of transfection was similar in the DARPP-32 or Luc-control siRNA-transfected cells as shown by the expression levels of the GFP protein as well as by microscopy (data not shown). Note also that the slight increase in the GFP signal observed in the pSGD-

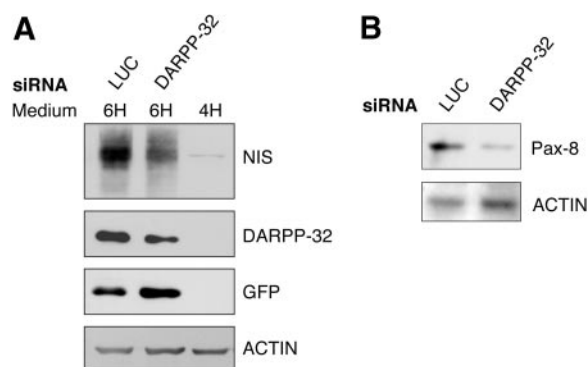


Fig. 3. Specific Silencing of DARPP-32 by siRNA Causes Lack of Expression of the Differentiation Markers NIS and Pax8

Western blots using extracts from the following: control PC Cl3 cells transfected with specific vectors to express the RNA interference for Luc or DARPP-32: pSuper-GFP-Luc (Luc), or with pSuper-GFP-DARPP-32 (DARPP-32); extracts from undifferentiated, quiescent PC Cl3 cells are shown as a negative control on Panel A. A, Specific depletion of the differentiation marker NIS when DARPP-32 is depleted. B, Specific depletion of Pax8 in cells transfected with the siRNA specific for DARPP-32.

transfected cells arises in part due to a marginal increased loading of this track as evidenced by a slightly increased actin signal.

Expression of thyroid final differentiation markers such as Tg or NIS is dependent on the transcription factor Pax8. We examined whether Pax8 levels were affected by the interference with DARPP-32 expression. Significantly, Western blotting using anti-Pax8 antibodies (Fig. 3B) indicated that on depletion of DARPP-32, Pax8 protein levels were also reduced to 20–30% of the control levels. The results are consistent with a model in which DARPP-32 depletion results in Pax8 depletion and consequent loss of the final differentiation markers Tg and NIS.

The results obtained using the pSuper-derived vectors were confirmed using DARPP-32-specific siRNA. Importantly, the efficacy of transfection using siRNA was much higher than with the pSuper-derived vectors and, compared with cells transfected with a non-silencing siRNA control, by 24 h post transfection virtually all DARPP-32 was eliminated from the cells as determined by Western blotting (Fig. 4A). DARPP-32 levels remained very low 3 d after transfection but by d 7 normal levels were recovered. We also monitored several differentiation markers by Western. Strikingly, depletion of DARPP-32 led to decreased levels of TTF1, as well as Tg and NIS, and the levels of these factors also recovered over time in parallel with DARPP-32. Actin was used as a loading control. Immunofluorescence assays using anti-DARPP-32 and anti-Tg together with confocal imaging confirmed the results of the Western analysis. Whereas both DARPP-32 and Tg were expressed robustly in control cells, siRNA-mediated depletion of DARPP-32 led to a

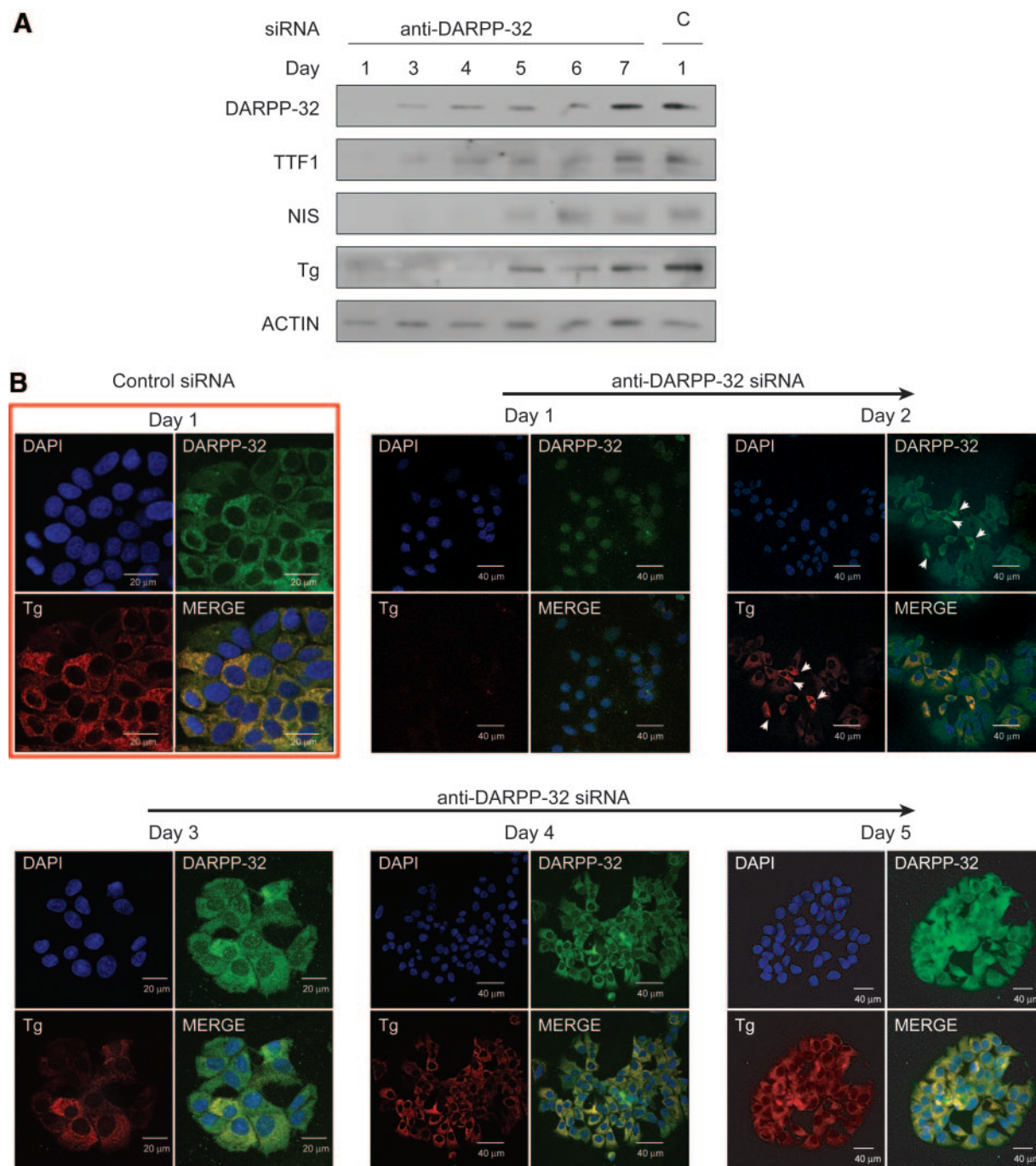


Fig. 4. DARPP-32 Depletion by siRNA Interference Causes Lack of Differentiation in Thyroid Cells

A, TTF1, Tg, and NIS are specifically depleted by the DARPP-32 siRNA. Western blot of total protein extracts from cells transfected with the Control siRNA (C) or the anti-DARPP-32-specific siRNA and collected on d 1–7. Control extracts correspond to d 1. B, Confocal images of cells transfected with the siRNAs Control or DARPP-32 specific. In each picture the DAPI staining shows total number of cells in the field: *green* is anti-DARPP-32 staining, and *red* is anti-Tg staining. Cells transfected with the control siRNA show normal levels of both DARPP-32 and Tg. DARPP-32 depleted cells collected from d 1–5 show the lack of both DARPP-32 and Tg and progressive recovery of both by d 5. The *arrows* on d 2 mark cells with a parallel recovery of both DARPP-32 and Tg expression. DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole.

dramatic reduction in both DARPP-32 and Tg expression within 1 d, the levels of both proteins recovering over time. Note that by d 2 some cells expressing

DARPP-32 were already visible and these cells also expressed Tg with the proportion of cells expressing both markers increased with time. Thus, the results

obtained using both the pSuper and siRNA are consistent with DARPP-32 playing a key role in the maintenance of differentiation.

Reintroduction of DARPP-32 into Ras-Transformed Cells Overcomes Their Inability to Activate the Tg and TPO Promoters

Upon DARPP-32 depletion, thyroid cells lose expression of differentiation markers such as Tg, suggesting that DARPP-32 is required for full thyroid cell differentiation. If DARPP-32 is required for Tg expression, then reintroduction of DARPP-32 in Ras-transformed thyroid cells that are devoid of DARPP-32 and Tg expression should enable them to reactivate the Tg promoter. Ha-ras-transformed cells were transiently transfected with the expression vector pEGFP-DARPP-32 and the fusion Tg promoter-luciferase reporter to quantify promoter activity (Fig. 5A). Consistent with previous reports (9) ectopic expression of TTF1 in these cells was not sufficient to activate the Tg promoter. However, ectopic expression of DARPP-32 resulted in activation of the Tg promoter (see a 2.5-fold increase in luciferase activity) consistent with DARPP-32 playing a role in differentiation, and TTF1 coexpression resulted in a marginal increase over the induction obtained by expression of DARPP-32. Previous studies (12) suggested that the equilibrium between kinases and phosphatases necessary to maintain TTF1 active is broken in Ha-ras-transformed thyroid cells as revealed by an altered phosphorylation pattern of TTF1. Therefore, exogenous DARPP-32 expression may increase the TTF1 levels and rescue the kinases/phosphatases equilibrium in Ha-ras-transformed cells rendering enough active TTF1 to

promote Tg promoter activity. Figure 5B shows similar results obtained with the TPO promoter, another classical differentiation marker. TPO promoter is silent in Ha-ras-transformed thyrocytes, and we show that after reexpressing DARPP-32 its activity increases 2-fold similarly to the Tg promoter. Coexpression of TTF1 and DARPP-32 only results in a marginal increase over that produced by DARPP-32 alone. These results further confirm that DARPP-32 plays a crucial role in signal transduction pathways leading to thyroid differentiation.

TSH and IGF-I Independently Up-Regulate DARPP-32 Levels

Because TSH and IGF-I are the most physiologically relevant stimuli for thyroid function and we have shown that DARPP-32 is required for thyroid differentiation, we wished to study whether these stimuli targeted DARPP-32 expression. Undifferentiated PC Cl3 cells cultivated in 4H medium for 8 d were treated with TSH and/or IGF-I for 24 h. Western blotting of total protein extracts (Fig. 6) revealed that TSH induced DARPP-32 expression 5- to 8-fold above basal levels after 24 h treatment. Similar results were obtained with IGF-I. Simultaneous addition of TSH and IGF-I resulted in a similar induction to that observed using either TSH or IGF-I. Actin was used as a loading control. Quantification of the results obtained in three independent experiments as is shown at the *bottom graphics* demonstrates that the extent of induction is similar with either or both stimuli.

Thus both TSH or IGF-I independently exert maximal DARPP-32 induction, and DARPP-32 is a common target for multiple signaling pathways involved in thyroid function or differentiation.

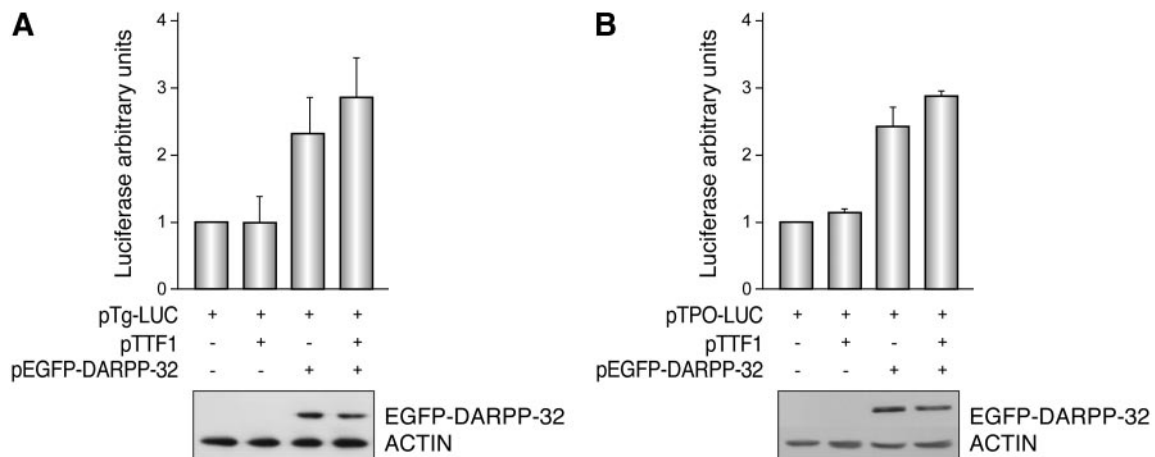


Fig. 5. DARPP-32 Reintroduction in H-ras-Transformed Cells Overcomes Their Inability to Activate the Tg and TPO Promoters. Ha-ras/FRTL-5 cells were transfected with the Tg (A) or TPO (B) promoter fused to the luciferase reporter and/or the TTF1 expression vector pTTF1 and/or pEGFP-N1 or the DARPP-32 expression construct pEGFP-DARPP-32. Relative luciferase activity normalized with *Renilla* was measured 72 h after transfection. Promoter activity is expressed as fold induction over basal level (=1) of the cells transfected with either the pTg (A) or pTPO (B) construct alone. The results represent the mean \pm SD of three independent experiments. The *bottom panels* show the expression levels of ectopically expressed DARPP-32 in one representative experiment. EGFP, Enhanced GFP.

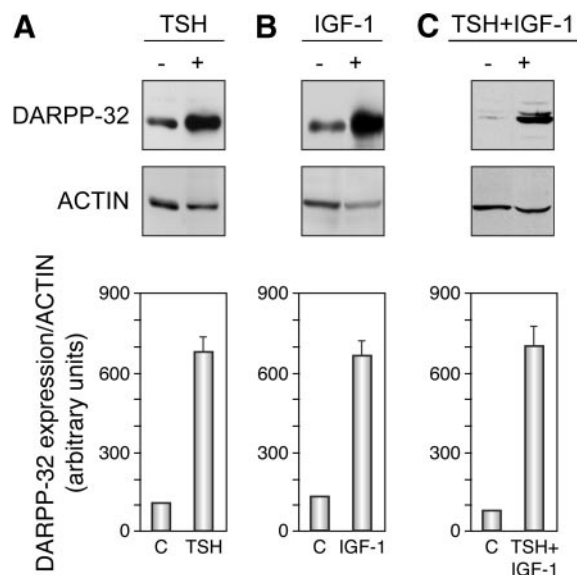


Fig. 6. TSH and IGF Independently Up-Regulate DARPP-32 Protein Levels

Western blot of total protein extracts from PC Cl3 cells cultivated for 9 d on 4H medium and supplemented (+) or not (–) with TSH, IGF-I, or both during the last 24 h. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

The PKA and PI3K Pathways Are Required for DARPP-32 Induction by TSH and IGF-I, Respectively

To unravel critical components of the signaling pathways from TSH or IGF-I to DARPP-32, we asked whether specific protein kinase inhibitors could affect the TSH- or IGF-I-mediated induction of DARPP-32 expression. We first used H89, an inhibitor of PKA. PC Cl3 cells cultivated in 4H medium for 8 d were pre-treated with 10 μ M H89 for a minimum of 30 min before addition of thyrotropin or IGF-I for 24 h. TSH and IGF-I in the absence of the inhibitor exerted an induction similar to that shown in the previous figures (data not shown). In contrast, H89 treatment abolished both TSH and IGF-I-mediated induction of DARPP-32 (Fig. 7A). Treatment with H89 alone did not modify basal levels of DARPP-32 after 30 min treatment (data not shown) or after 24 h (compare first and last lanes).

The PI3K pathway plays an important role in thyroid cell signal transduction downstream of IGF-I (13), and it has been reported to cross talk with TSH signaling (14) (15). To determine whether PI3K was important for DARPP-32 regulation, PC Cl3 cells cultivated in 4H medium were treated with the PI3K inhibitor LY294002, as described previously for H89. Again, in the absence of the inhibitor, DARPP-32 was induced by IGF-I and TSH as expected (data not shown). Strikingly, LY294002 treatment depleted DARPP-32 after 24 h (Fig. 7B; compare first and last lanes), suggesting that PI3K signaling is required to maintain DARPP-32 expression. In the presence of LY294002, IGF-I was inactive, neither leading to an induction of DARPP-32

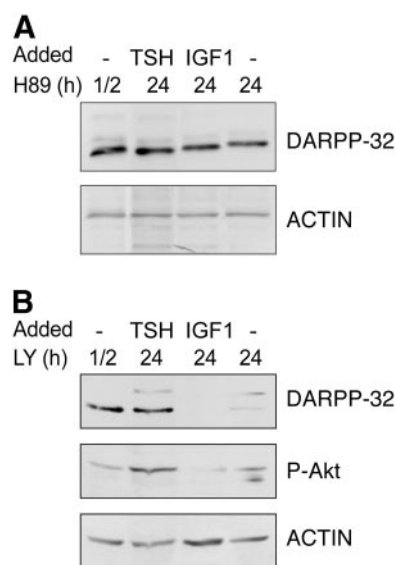


Fig. 7. Signaling from TSH and IGF-I to DARPP-32 Involves Both PKA and PI3K

Western blots of total protein extracts. A, Treatment of PC Cl3 cells with H89, an inhibitor of PKA and S6K inhibits DARPP-32 induction by TSH and by IGF-I. B, LY294002, an inhibitor of PI3K, prevents IGF-I induction and depletes basal levels of DARPP-32. LY, LY294002.

expression nor preventing the loss of basal expression. By contrast, TSH restored the basal level of DARPP-32 expression, suggesting that the ability of TSH to induce DARPP-32 was not inhibited by LY294002. Taken together, the results suggest that TSH may use the PKA pathway to induce DARPP-32, whereas the effects of IGF-I would require PI3K signaling. Note that because H89 has also been shown to inhibit the PI3K/PDK1 substrate S6K1 with the same or greater potency (16), the failure of IGF-I to induce DARPP-32 expression in the presence of H89 could be due to inhibition of S6K1 rather than PKA, or to a cross talk between these pathways (17). The PI3K inhibitor LY294002, but not H89, blocks basal expression of DARPP-32, suggesting that the PI3K-dependent pathway required for DARPP-32 basal expression is p70S6K-independent.

TSH and IGF-I Promote DARPP-32 Phosphorylation at Thr34

So far we could block differentiation by depleting DARPP-32 in thyroid cells and conversely promote differentiation by reintroduction of DARPP-32 in cells poorly expressing the protein. Moreover, TSH and IGF-I, the most physiologically relevant stimuli for thyroid function, induced DARPP-32 accumulation. DARPP-32 function depends on its phosphorylation status: when phosphorylated on Thr75 DARPP-32 inhibits PKA while phosphorylated on Thr34 inhibits PP1, these phosphorylation events being mutually exclusive (*i.e.* phospho Thr34 DARPP-32 cannot be

phosphorylated at Thr75 and vice versa). We were unable to detect P-Thr75 DARPP-32 in our cells but could easily detect the P-Thr34 form that inhibits PP1 (Fig. 8). Furthermore, we observed that both TSH and IGF-I independently induced phosphorylation of DARPP-32 at Thr34 (Fig. 8A). P-Thr34-DARPP-32 induction by TSH peaks at 12 h of treatment (5- to 6-fold) and by 24 h is approximately 3-fold relative to actin levels. IGF-I induction of P-Thr34-DARPP-32 was also 3- to 4-fold at 12 h and still increased up to 6-fold at 24 h (Fig. 8B). TSH induction of P-Thr34 was mediated via PKA because it was prevented by its inhibitor H89 (Fig. 9A). Induction of P-Thr34 at 12 h by IGF-I was unaffected by H89, but the phosphorylation of DARPP-32 was transient with no signal being apparent by 24 h, in contrast to cells not treated with the inhibitor (see Fig. 8B). The PI3K inhibitor LY294002 did not affect TSH-induced phosphorylation of DARPP-32 (Fig. 9B). Any effect of LY294002 on IGF-I-induced phosphorylation of DARPP-32 was difficult to assess given our observation that this inhibitor abolishes basal and IGF-I induced DARPP-32 expression (see Fig. 7B). We were consequently unable to detect P-Thr34 DARPP-32 in the presence of LY294002 alone or with IGF-I. In the absence of any inhibitor, IGF-I and TSH induced DARPP-32 phosphorylation as expected (data not shown). These data suggest that both TSH and IGF-I induce DARPP-32 expression and, through phosphorylation of DARPP-32 at Thr34, convert it into a potent inhibitor of PP1.

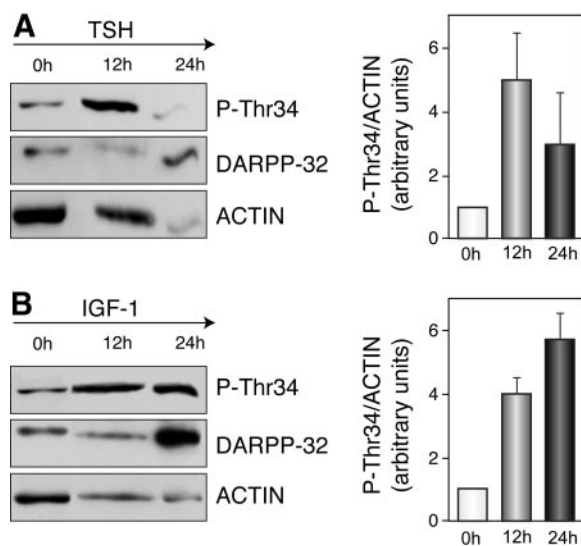


Fig. 8. TSH and IGF-I Promote DARPP-32 Phosphorylation at Thr34

Western blot of total protein extracts from PC Cl3 cells cultivated for 9 d on 4H medium and supplemented (+) or not (–) with TSH, IGF-I, or both during the last 12–24 h. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

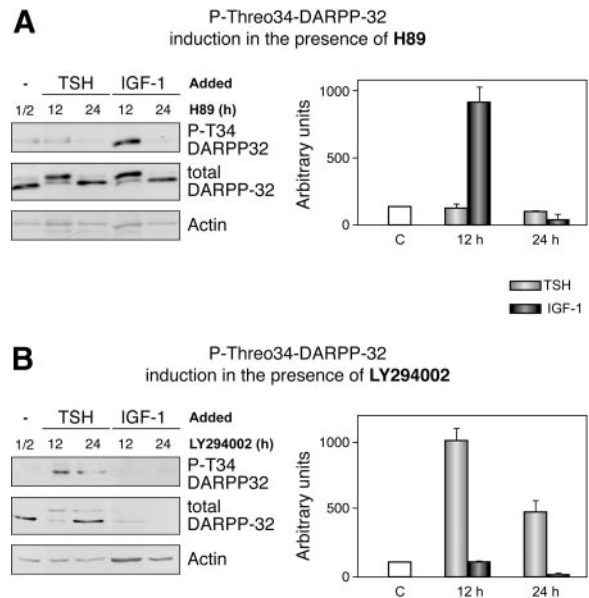


Fig. 9. TSH-Dependent Thr34 Phosphorylation of DARPP-32 Is Mediated by PKA and the IGF-I-Dependent Phosphorylation Occurs via PI3K

Western blots of total protein extracts. A, Treatment of PC Cl3 cells with H89 inhibits TSH-mediated, but not IGF-I mediated, phosphorylation of DARPP-32 at Thr34. B, LY294002, an inhibitor of PI3K, prevents IGF-I mediated phosphorylation of DARPP-32 at Thr34 but not the TSH-dependent phosphorylation. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

DISCUSSION

DARPP-32 is a bifunctional molecule the expression of which was once believed to be restricted to dopaminergic neurons in discrete regions of the brain where its function has been extensively studied. Its importance in neurons is highlighted by the fact that more than 10 different signaling pathways alter this molecule, and its function has been implicated in a number of diseases including Parkinson, Huntington, schizophrenia, hyperactivity and attention deficit syndrome, and long-term depression (18). Neuronal DARPP-32 has been shown to mediate the effects of dopamine, cocaine, serotonin, fluoxetine (Prozac), and caffeine and a range of other molecules. Here we report the finding that DARPP-32 is expressed in normal thyroid gland and thyroid cell lines. More importantly, we provide four lines of evidence that DARPP-32 is essential for the maintenance of thyroid cell differentiation. First, thyroid cells kept undifferentiated in 4H medium possess low basal DARPP-32 levels, which are inducible by TSH or IGF-I as are other differentiation markers. TSH and IGF-I induction of thyroid differentiation has been widely documented before (19, 20, 21, 22) although this is the first report of DARPP-32 expression in these cells. Second, there is a good correlation between DARPP-32 levels and the degree of differentiation. Thus, DARPP-32 is absent in

tumoral (FRO) or Ras-transformed thyroid cell lines and in the undifferentiated but nontransformed thyroid cell line FRT. Third, siRNA-mediated silencing of DARPP-32 leads to a dramatic inhibition of expression of the key thyroid transcription factors, Pax8 and TTF1, and probably as a consequence of thyroid-specific differentiation markers such as Tg and NIS. Fourth, reintroduction of DARPP-32 in Ha-ras-transformed thyroid cells enables them to activate the otherwise silent Tg promoter.

TSH and IGF-I cooperate to promote thyrocyte proliferation and function (3, 23). We demonstrate that both TSH and IGF-I induce total DARPP-32 accumulation and also its phosphorylation at Thr34, thereby converting it into a potent inhibitor of PP1. Phosphorylation of DARPP-32 on Thr34 prevents its phosphorylation at Thr75, a form of the protein that inhibits PKA. The lack of P-Thr75 DARPP-32 in thyroid cells possibly reflects the importance of an active PKA pathway for these cells to survive or differentiate. Moreover, the mechanisms by which TSH and IGF-I induce accumulation of total DARPP-32 are different: TSH induction occurs through mRNA accumulation, whereas IGF-I induction appears to be posttranscriptional (our manuscript in preparation).

Conversely, we have also tested the hypothesis that DARPP-32 may increase TSH and IGF-I receptor levels giving rise to a positive feedback loop involving TSH/IGF-I, their receptors, and DARPP-32. We detected a significant decrease in IGF-I R but not in TSH receptor (TSH-R) levels after silencing DARPP-32 (our unpublished observations). However, under our conditions the quality of the TSH-R antibody does not allow us to discard a hypothetical decrease of the TSH-R in cells transfected with DARPP-32-specific siRNA. Nevertheless it is generally accepted that failures in signaling intermediates from the TSH-R are responsible for the lack of differentiation. Accordingly, in a recent study by Di Lauro and associates (24), Ha-ras-transformed thyrocytes are shown to differentiate in response to TSH only when Ras is expressed at low dose but not at high dose. It would therefore be particularly interesting to determine whether DARPP-32 expression levels parallels Ras dose in their system.

Proliferation of thyroid cells, on the other hand, does not seem to be controlled by DARPP-32 levels. We did not observe an effect of DARPP-32 on thyroid cell proliferation neither when we depleted it from normally growing thyroid cells nor on its reintroduction into Ha-ras-transformed cells. Moreover, thyroid cells with proliferation rates varying from the very high (Ras-transformed and tumoral) to the nonproliferative thyroid cells cultivated in 4H medium have undetectable or very low DARPP-32 levels.

Malignant transformation is often characterized by dedifferentiation. Consistent with this, Ras-mediated transformation of thyroid cells or naturally occurring thyroid tumor cell lines exhibit a loss of differentiation markers such as Tg and NIS. Our results presented

here indicate that DARPP-32 expression is also lost in transformed and tumoral thyroid cells and may represent a useful marker for the progression of thyroid carcinoma. In contrast, in gastric cancers (25) and some common adenocarcinomas DARPP-32 is overexpressed (26) compared with their normal untransformed parental cell types. Future research will uncover any potential role of DARPP-32 in cancer progression. Nevertheless, the evidence suggests that DARPP-32 may lie at the nexus of multiple signaling pathways that modulate or maintain the differentiation state of a given cell type.

IGF-I-dependent induction of DARPP-32 in thyroid cells, mediated by activation of PI3K, is reminiscent of the PI3K-dependent induction of DARPP-32 in neurons by brain-derived neurotrophic factor acting through its tyrosine kinase receptor (27), and it may be a general theme that receptor tyrosine kinases in other cell types may use this signaling pathway to regulate DARPP-32 expression. Indeed, although we have focused here on the effects of TSH and IGF-I on thyroid, TSH and IGF-I receptors are also expressed in neurons (28, 29), and, potentially, neuronal DARPP-32 levels could be subjected to similar regulation. This may be particularly important for understanding the link between metabolic and psychological effects of drugs targeting neuronal function. Thus, DARPP-32 may be viewed as a third messenger of hormones, growth factors and neurotransmitter action.

In thyroid, the role of DARPP-32 appears to be in mediating the effects of TSH and IGF-I in differentiation. Thus, in the absence of TSH or IGF-I, or on depletion of DARPP-32, we observe a loss of expression of the thyroid differentiation markers Tg and NIS. Iodination of Tg residues is essential for the differentiated function of the thyrocyte and depends on functional NIS at the membrane. The expression levels of NIS at the membrane directly correlate with iodide uptake both in thyroid and nonthyroid cells (30, 31). We have examined NIS expression at the membrane after DARPP-32 silencing in thyrocytes, and we observe a direct correlation between the levels of DARPP-32 and the membrane population of NIS (data not shown). The expression of these final differentiation markers depends on the activity of “teams” of cell-specific and ubiquitous transcription factors (1), the most important among them being TTF1, TTF2, and Pax8. Pax8 has been previously shown to be required for differentiation of competent endoderm into follicular thyroid cells producing thyroid hormones (32), and our results suggest that DARPP-32 is necessary to maintain the Pax8 expression/activity required for differentiation promoted by TSH and IGF-I. We also show that DARPP-32 expression is necessary to maintain adequate levels of active TTF1. Ha-ras-transformed thyroid cells contain low levels of inappropriately phosphorylated, and therefore inactive, TTF1 (12). Reintroduction of DARPP-32 capable of inhibiting PP1 might be therefore necessary for correct TTF1 and Pax8 phosphorylation and activity and

therefore reexpression of DARPP-32 in Ha-ras-transformed thyrocytes results in reactivation of the Tg and TPO promoter. As far as we are aware, this is the first demonstration that DARPP-32 as an integrator of signal transduction pathways plays a key role in differentiation. Our data could be particularly relevant in adipocytes where it has been reported that DARPP-32 levels dramatically increase upon 3T3-L1 differentiation toward adipocytes (33).

We suggest for thyroid cells the model depicted in Fig. 10. In this model, the principal role of DARPP-32 (Fig. 10B) is to inhibit the activity of PP1 and thereby stabilize the TSH and IGF-I-induced phosphorylation and activation of key transcription factors. Basal levels of DARPP-32 are required to amplify immediately the TSH and IGF-I effects. TSH and IGF-I stimulation (via PKA and PI3K, respectively) will induce phosphorylations affecting the levels and activity of transcription factors (Pax8, TTF1), which will turn on transcription of differentiation markers (Tg, NIS). TSH/IGF-I-induced accumulation and phosphorylation of DARPP-32 at Thr34 turns off the general phosphatase PP1 maintaining high levels of phosphorylated transcription fac-

tors, which prolongs the initial phosphorylation events allowing accumulation of differentiation markers. The effects of TSH and IGF-I would then be further amplified by their ability to induce DARPP-32 expression. By contrast, in cells lacking DARPP-32 expression (Fig. 10A), unrestricted PP1 activity will reverse any TSH- and IGF-I-induced phosphorylation of TTF1 and Pax8. Any effect of TSH and IGF-I signaling would therefore be transient and insufficient to support the accumulation of active Pax8 and TTF1, and full differentiation would not be possible.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Cell lines used in this work were: rat thyroid follicular FRTL-5 (34) (ATCC CRL 8305; American Type Culture Collection, Manassas, VA), Ha-ras- and K-ras-transformed FRTL-5 cells (35), rat PC Cl3 (36), rat FRT (11), and human FRO (10). The cells were cultured in Coon's modified Ham's F-12 medium supplemented with 5% donor calf serum, glutamine, antibiotics, and a six-hormone mixture (1 nM TSH, 10 μ g/ml insulin,

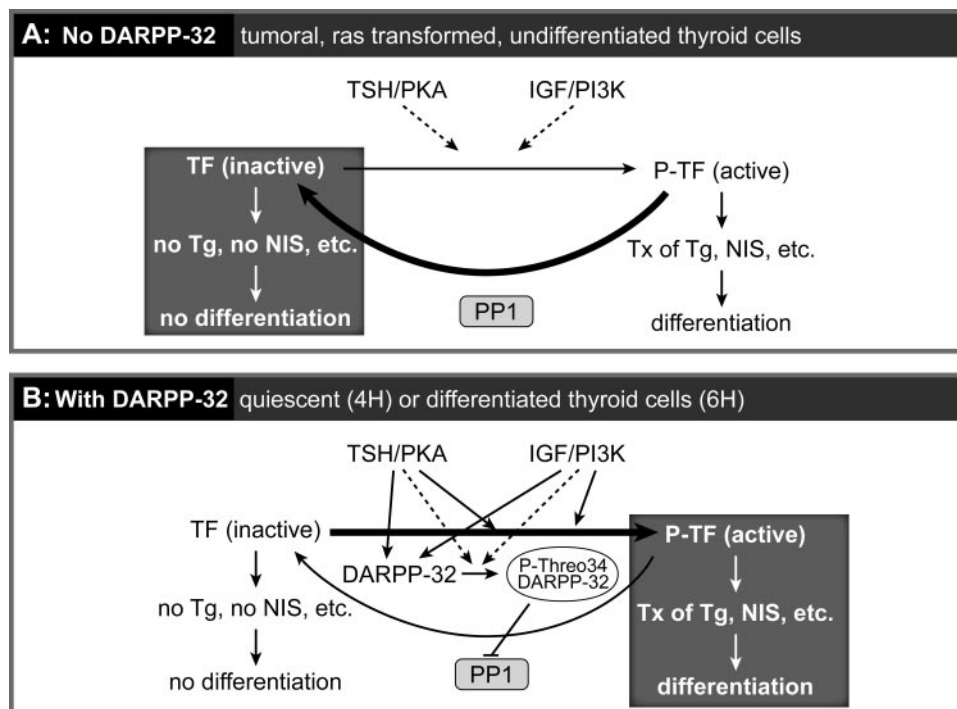


Fig. 10. A Model for the Role of DARPP-32 in Thyroid

In thyroid cells, phosphorylation of transcription factors (P-TFs) such as Pax8 and TTF1 in response to TSH and IGF-I signaling is required for their activation and consequently for their ability to activate transcription (Tx) of differentiation specific genes. In tumoral (FRO), Ras-transformed, or undifferentiated thyroid cells (FRT) lacking DARPP-32 (panel A), the ability of TSH and IGF-I to promote phosphorylation of transcription factors is largely reversed by the action of PP1. Consequently, the cells are undifferentiated. By contrast, in differentiated thyroid cells expressing DARPP-32 (panel B), the presence of active DARPP-32 (phosphorylated at Thr34) will lead to inhibition of PP1 and consequently IGF-I and TSH signaling will lead to the stable phosphorylation and activation of transcription factors that promote the expression of differentiation genes (Tg, NIS, etc.). In quiescent thyroid cells the low level of DARPP-32 expression observed should allow IGF-I and TSH to initiate the differentiation program, whereas the ability of IGF-I and TSH to increase DARPP-32 expression and activity will then amplify the pro-differentiation signals.

10 ng/ml somatostatin 10 μ g/ml transferrin, 10 nM hydrocortisone, and 10 ng/ml glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate). The effect of TSH and IGF-I was studied by starving nearly confluent cells of TSH, IGF-I, and serum (0.1%) for 8–9 d (4H medium). TSH (1 nM) and/or IGF-I (100 ng/ml) were added for 24 h. Inhibitors (when used) were added to the cells 30 min before addition of TSH or IGF-I at the concentration of 10 nM in both cases (both from Calbiochem, La Jolla, CA) and maintained for 24 h. Appropriated controls were established (*i.e.* 4H \pm inhibitor for 30 min, 4H \pm inhibitor for 24 h, 4H \pm inhibitor \pm TSH). Tissue culture media and bovine TSH were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). IGF-I was obtained from Preprotech (Rocky Hill, NJ). Donor calf serum was purchased from Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD). The medium was changed every 2 d.

RNA Extraction and Northern Blot Analysis

Total RNA was isolated by the guanidinium-thiocyanate-phenol method (37) from the indicated cell lines or tissues after the indicated treatments. Total RNA (20 μ g) was separated in 1% agarose gels containing 2.2 M formaldehyde. RNA was blotted onto Nytran filters (Schleicher & Schuell, Keene, NH) as suggested by the manufacturer. Methylene blue staining of the blots revealed the integrity of the RNA and the presence of equal amounts in each lane. Hybridization and washing were carried out with a rat cDNA DARPP-32-specific probe kindly donated by Dr. Greengard (Laboratory of Molecular and Cellular Neuroscience, Rockefeller University, New York, NY) and labeled by Random oligo priming.

Protein Extraction, Western Blot, and Immunodetection

Total protein extracts were obtained by scraping the cells in RIPA buffer. Fractionated (cytoplasmic, nuclear) protein extracts from the indicated cell lines were obtained as described in Ref. 38; membrane fractions were isolated as described in Ref. 39. Protein extracts (20 μ g) were separated in 6–12% SDS-PAGE gels and immunodetected after Western blotting. Antitotal DARPP-32 and anti-P Threo 34-DARPP32 antibodies were kindly donated by Dr. Greengard, and the other antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Secondary antibodies were horseradish peroxidase conjugated and detected by autoradiography. Equal protein loading was first monitored by Bradford assays and after transfer by detection of the nonregulated proteins, cdk5 or β -actin.

Constructs

A cytomegalovirus-GFP-PolyA fragment digested with *Asel*/*Mlu*I out of the pEGFP-C3 vector (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) previously deleted of the multiple cloning site by *Bam*HI/*Bgl*II digestion and religation was cloned into the *Sma*I site of pSuper and pSuper-Luc plasmids (Oligo-engine) generating the intermediate plasmid pSuperGFP (pSG) and the final construct pSuperGFPLuc (pSGL). The following oligonucleotide sequences were designed and purchased from QIAGEN (UK) to synthesize the specific DARPP-32 RNAi: Oligo1: 5'-GAT CCC CAA GTC GAAGAG ACC CAA CCT TCA AGA GAG GTT GGG TCT CTT CGA CTT TTT TTG GAA A-3' and oligo 2: 5'-AGC TTT TCC AAA AAA AGT CGA AGA GAC CCA ACC TCT CTT GAA GGT TGG GTC TCT TCG ACT TGG G-3'; the oligos were annealed and phosphorylated using polynucleotide kinase from Promega Corp. (Madison, WI) and introduced into the *Bgl*II/*Hind*III sites of pSG, generating the final construct pSuperGFP-DARPP (pSGD).

Ha-ras-transformed FRTL-5 cells were transfected with: pTg as described in Ref. 40 or pTPO promoter as described previously (9); pTTF1 (expression vector for TTF1) as de-

scribed in (41); and/or pEGFP-DARPP-32, which was constructed by cloning DARPP-32 into the *Bgl*II/*Eco*RI sites of the pEGFP N1 vector (CLONTECH). pRL-CMV, a vector containing cDNA encoding *Renilla* (Promega), was cotransfected to monitor transfection efficiency. DARPP-32 siRNA oligonucleotides with sequences r(CCCUGCCUJGUCGUUCCG)d(TT) and r(CGGAACAGCAAGGCAGGG)d(TT) and control siRNA oligonucleotides with sequences r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)d(TT) and r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)d(TT) were purchased from QIAGEN (Chatsworth, CA) and annealed according to manufacturer's instructions.

Transfection

PC Cl3 cells were transfected while plated using Fugene (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) and following manufacturer suggestions. For microscopy and Western analysis of the siRNA, cells were transfected on cover slips at 10^4 cells per well in 24-well dishes. In every experiment 12 wells were transfected with the control construct pSGL containing the sequence to synthesize the luciferase siRNA and 12 wells were transfected with the construct pSGD containing the sequence for DARPP-32 siRNA and above described. Maximum GFP expression was reached 5–6 d after transfection and monitored directly using the green filter under the fluorescence microscope. Alternatively, siRNA oligoribonucleotides, either control or DARPP-32 specific, were transfected into cells (plated at 10^4 cells per well the previous day) using Oligofectamine (Invitrogen, San Diego, CA) and following manufacturer's instructions. The medium was changed 24 h later and every 2 d afterward. Cells transfected directly with the siRNAs were collected on d 1–7 after transfection to analyze the expression of DARPP-32, Tg, NIS, *etc.* by immunofluorescence or Western blotting.

Transfection of Ha-ras cells to assay the ability of the Tg promoter to direct luciferase transcription was also done using Fugene Reagent. cDNAs transfected included pTg-LUC, pRL-CMV, and either the pEGFP-DARPP-32 construct or the pEGFP-N1 empty vector and/or pTTF1 (1 μ g each except for the pRL-CMV that was 0.5 μ g).

Indirect Immunofluorescence

Cells in cover slips were washed three times and fixed in Methanol at -20°C for 10 min; washed again and blocked with PBS containing 5% donor calf serum and 0.05% Tween for 1 h at room temperature, incubated with anti-DARPP-32 or anti-Tg antibody for 20 min at R/T, washed in PBS-Tween three times for 5 min, incubated with the secondary antibody Alexa 488 or Texas Red conjugated, respectively, washed again three times with PBS-Tween and mounted on Vectashield containing 4',6'-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Cells were observed under epifluorescent (Axiophot; Carl Zeiss, Thornwood, NY) using $\times 63$ magnification on oil immersion objective or confocal microscopy (Leica Corp., Deerfield, IL). Images were recorded in a Olympus DP70 camera (Olympus Corp., Lake Success, NY) using DP70-BSW software.

Acknowledgments

We thank Dr. P. Greengard (Laboratory of Molecular and Cell Neuroscience, Rockefeller University, New York, NY) for kindly providing anti-DARPP-32 antibodies and a rat DARPP-32 cDNA expression vector; Dr. L. D. Kohn (Edison Biotech Institute, Athens, OH) for FRTL-5 cells; Dr. R. Di Lauro (Stazione Zoologica, A. Dohrn, Naples, Italy) for Ras-transformed and FRT cell lines; Dr. Fusco (Universita degli Studi di Napoli Federico II, Italy) for PC Cl3; and Dr. Fagin (University of Cincinnati, Cincinnati, OH) for FRO cells. We also thank members of Dr. P. Santisteban's laboratory for

critical reading of the manuscript and Dr. C. Goding for invaluable support throughout this work.

Received March 18, 2005. Accepted July 7, 2005.

Address all correspondence and requests for reprints to: Custodia García-Jiménez, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols,” Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain. E-mail: custodia.garcia@urjc.es.

This work was supported by Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Grant BFU2004-03169, GR/SAL 0773/2004 from Comunidad de Madrid and Fondo de Investigaciones Sanitarias of the Instituto de Salud Carlos III (RCMN-C03/08, RCGC C03/10) and PI041216. M.A.Z. was the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

Part of this work was presented at the Meeting of the European Thyroid Association, Edinburgh, Scotland, United Kingdom, 2003, and was awarded the M. Köning Prize financed by Organon (Oss, The Netherlands).

REFERENCES

- Damante G, Tell G, Di Lauro R 2001 A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66:307–356
- Ortiz L, Zannini M, Di Lauro R, Santisteban P 1997 Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* 272:23334–23339
- Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP 2001 Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of *in vitro* models. *Endocr Rev* 22:631–656
- Dremier S, Coulonval K, Perpete S, Vandeput F, Fortemaison N, Van Keymeulen A, Deleu S, Ledent C, Clement S, Schurmans S, Dumont JE, Lamy F, Roger PP, Maenhaut C 2002 The role of cyclic AMP and its effect on protein kinase A in the mitogenic action of thyrotropin on the thyroid cell. *Ann NY Acad Sci* 968:106–121
- Foubister V 2002 Do all paths lead to DARPP-32? *Drug Discov Today* 7:1068–1070
- Fienberg AA, Greengard P 2000 The DARPP-32 knock-out mouse. *Brain Res Brain Res Rev* 31:313–319
- Lacroix L, Pourcher T, Magnon C, Bellon N, Talbot M, Intaraphairot T, Caillou B, Schlumberger M, Bidart JM 2004 Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1423–1428
- Matovcik LM, Hemmings Jr HC, Kinder BK 1995 DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32,000) is a membrane protein in the bovine parathyroid. *FEBS Lett* 364:67–74
- Francis-Lang H, Zannini M, De Felice M, Berlingieri MT, Fusco A, Di Lauro R 1992 Multiple mechanisms of interference between transformation and differentiation in thyroid cells. *Mol Cell Biol* 12:5793–5800
- Elisei R, Shiohara M, Koeffler HP, Fagin JA 1998 Genetic and epigenetic alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitors p15INK4b and p16INK4a in human thyroid carcinoma cell lines and primary thyroid carcinomas. *Cancer* 83:2185–2193
- Mascia A, De Felice M, Lipardi C, Gentile R, Cali G, Zannini M, Di Lauro R, Nitsch L 1997 Transfection of TTF-1 gene induces thyroglobulin gene expression in undifferentiated FRT cells. *Biochim Biophys Acta* 1354:171–181
- Velasco JA, Acebron A, Zannini M, Martin-Perez J, Di Lauro R, Santisteban P 1998 Ha-ras interference with thyroid cell differentiation is associated with a down-regulation of thyroid transcription factor-1 phosphorylation. *Endocrinology* 139:2796–2802
- Coulonval K, Vandeput F, Stein RC, Kozma SC, Lamy F, Dumont JE 2000 Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B and ribosomal S6 kinases in the stimulation of thyroid epithelial cell proliferation by cAMP and growth factors in the presence of insulin. *Biochem J* 348:351–358
- Suh JM, Song JH, Kim DW, Kim H, Chung HK, Hwang JH, Kim JM, Hwang ES, Chung J, Han JH, Cho BY, Ro HK, Shong M 2003 Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase, Akt/protein kinase B, FRAP/mammalian target of rapamycin, and ribosomal S6 kinase 1 signaling pathways by thyroid-stimulating hormone (TSH) and stimulating type TSH receptor antibodies in the thyroid gland. *J Biol Chem* 278:21960–21971
- Richards JS 2001 New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15:209–218
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P 2000 Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95–105
- Cass LA, Meinkoth JL 2000 Ras signaling through PI3K confers hormone-independent proliferation that is compatible with differentiation. *Oncogene* 19:924–932
- Svenningsson P, Tzavara ET, Liu F, Fienberg AA, Nomikos GG, Greengard P 2002 DARPP-32 mediates serotonergic neurotransmission in the forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3188–3193
- Santisteban P, Kohn LD, Di Lauro R 1987 Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells. *J Biol Chem* 262:4048–4052
- Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N 1997 Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5568–5573
- Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T 1997 Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 138:2227–2232
- Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M 2002 Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells. *J Endocrinol* 172:163–176
- Medina DL, Santisteban P 2000 Thyrotropin dependent proliferation of *in vitro* rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* 143:161–178
- De Vita G, Bauer L, da Costa VM, De Felice M, Baratta MG, De Menna M, Di Lauro R 2005 Dose-dependent inhibition of thyroid differentiation by RAS oncogenes. *Mol Endocrinol* 19:76–89
- El-Rifai W, Smith Jr MF, Li G, Beckler A, Carl VS, Montgomery E, Knuttila S, Moskaluk CA, Frierson Jr HF, Powell SM 2002 Gastric cancers overexpress DARPP-32 and a novel isoform, t-DARPP. *Cancer Res* 62:4061–4064
- Beckler A, Moskaluk CA, Zaika A, Hampton GM, Powell SM, Frierson Jr HF, El-Rifai W 2003 Overexpression of the 32-kilodalton dopamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein in common adenocarcinomas. *Cancer* 98:1547–1551
- Stroppolo A, Guinea B, Tian C, Sommer J, Ehrlich ME 2001 Role of phosphatidylinositol 3-kinase in brain-derived neurotrophic factor-induced DARPP-32 expression in medium size spiny neurons *in vitro*. *J Neurochem* 79:1027–1032
- Bockmann J, Winter C, Wittkowski W, Kreutz MR, Bockers TM 1997 Cloning and expression of a brain-derived TSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 238:173–178

29. Labudova O, Cairns N, Koeck T, Kitzmueller E, Rink H, Lubec G 1999 Thyroid stimulating hormone-receptor overexpression in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Life Sci* 64:1037–1044
30. Wapnir IL, Goris M, Yudd A, Dohan O, Adelman D, Nowels K, Carrasco N 2004 The Na⁺/I⁻ symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. *Clin Cancer Res* 10:4294–4302
31. Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC 2005 In vivo radiiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1-driven expression of the sodium iodide symporter. *Clin Cancer Res* 11:1483–1489
32. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P 1998 Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 19:87–90
33. Brady MJ, Nairn AC, Saltiel AR 1997 The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3–L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J Biol Chem* 272:29698–29703
34. Ambesi-Impiombato FS, Villone G 1987 The FRTL-5 thyroid cell strain as a model for studies on thyroid cell growth. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 281:242–245
35. Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G 1987 One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* 7:3365–3370
36. Kimura T, Dumont JE, Fusco A, Golstein J 1999 Insulin and TSH promote growth in size of PC Cl3 rat thyroid cells, possibly via a pathway different from DNA synthesis: comparison with FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol* 140:94–103
37. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
38. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG 1983 Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11:1475–1489
39. Garcia B, Santisteban P 2002 PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* 16:342–352
40. Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R 1990 Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J* 9:3631–3639



Molecular Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Gβγ Dimers Released in Response to Thyrotropin Activate Phosphoinositide 3-Kinase and Regulate Gene Expression in Thyroid Cells

Miguel A. Zaballos,* Bibian Garcia,* and Pilar Santisteban

Instituto de Investigaciones Biomedicas “Alberto Sols,” Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain

Signaling by TSH through its receptor leads to the dissociation of trimeric G proteins into G α and G $\beta\gamma$. G α s activates adenylyl cyclase, which increases cAMP levels that induce several effects in the thyroid cell, including transcription of the sodium-iodide symporter (NIS) gene through a mechanism involving Pax8 binding to the NIS promoter. Much less is known about the function of G $\beta\gamma$ in thyroid differentiation, and therefore we studied their role in TSH signaling. G $\beta\gamma$ overexpression inhibits NIS promoter activation and reduces NIS protein accumulation in response to TSH and forskolin. Conversely, inhibition of G $\beta\gamma$ -dependent pathways increases NIS promoter activity elicited by TSH but does not modify forskolin-induced activation. G $\beta\gamma$ dimers are being released from the Gs subfamily of proteins, because cholera toxin mimics the effects elicited by TSH, whereas per-

tussis toxin has no effect on NIS promoter activity. We also found that TSH stimulates Akt phosphorylation in a phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-dependent and cAMP-independent manner. This is mediated by G $\beta\gamma$, because its overexpression or specific sequestration, respectively, increased or reduced phosphorylated Akt levels upon TSH stimulation. G $\beta\gamma$ sequestration increases NIS protein levels induced by TSH and Pax8 binding to the NIS promoter, which is also increased by PI3K inhibition. This is, at least in part, caused by G $\beta\gamma$ -mediated Pax8 exclusion from the nucleus that is attenuated when PI3K activity is blocked. These data unequivocally demonstrate that G $\beta\gamma$ released by TSH action stimulate PI3K, inhibiting NIS gene expression in a cAMP-independent manner due to a decrease in Pax8 binding to the NIS promoter. (*Molecular Endocrinology* 22: 1183–1199, 2008)

TSH, A HETERODIMERIC GLYCOPROTEIN hormone synthesized by pituitary thyrotrophs, is considered to be the main regulator of thyroid function. TSH action is initiated by its binding to the G protein-coupled TSH receptor (TSHR), a seven-transmembrane receptor located at the surface of thyrocytes that regulates thyroid cell proliferation and differentiation (1–3). Thyroid cell differentiation induced by TSH involves the expression of the different genes required for thyroid hormone synthesis such as the sodium iodide symporter (NIS), thyroglobulin (Tg), and thyroperoxidase (TPO). The NIS protein mediates iodide

uptake by the thyroid follicular cell, a process that constitutes the first step in thyroid hormone biosynthesis (4, 5). Iodide is subsequently incorporated by TPO into the Tg molecule. TSH also controls the functional activity of several transcription factors necessary for the expression of these genes such as Pax8, TTF1/NKx2.1, and TTF2/FoxE1. Pax8 has been reported to be the main transcription factor regulating NIS gene expression. Stimulation of NIS gene expression by TSH requires the binding of Pax8 to an enhancer element within the NIS promoter [NIS upstream enhancer(NUE)] (6). Pax8, together with TTF1, also regulates Tg and TPO expression (7), although for these genes, FoxE1 is the main mediator of TSH action (8, 9).

Activation of the TSHR in thyroid membranes induces the coupling to different G proteins: Gs, Gq/11, and different subtypes of Gi and Go as well as G12 and G13 (10–12). Stimulation of the TSHR leads to the dissociation of trimeric G proteins into G α and G $\beta\gamma$ subunits that in turn trigger complex signaling cascades. Most of the activities of the TSHR are mediated through the Gs protein, which activates the adenylyl cyclase/cAMP cascade (1). The increased intracellular concentration of cAMP activates protein kinase A (PKA), which is required for thyroid cell differentiation and proliferation (13). Other signaling pathways activated by cAMP include the cAMP-binding GTP-ex-

First Published Online January 17, 2008

* M.A.Z. and B.G. contributed equally to this work.

Abbreviations: β ARK, β -Adrenergic receptor kinase; cAMP-GEF, cAMP-binding GTP-exchange factor; CRE, cAMP response element; CREB, CRE-binding protein; CTX, cholera toxin; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; G α T, transducin G α subunit; GPCR, G protein-coupled receptor; hrTSH human recombinant TSH; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; NIS, sodium iodide symporter; NUE, NIS upstream enhancer; pAkt, phosphorylated Akt; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKA, protein kinase A; PTX, pertussis toxin; Rp-cAMP, adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer, triethylammonium salt; Tg, thyroglobulin; TPO, thyroperoxidase; TSHR, TSH receptor.

Molecular Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

change factors (cAMP-GEFs or Epac) that function as exchange factors for the small GTPases Rap1 (14, 15), Rap2 (16), and Ras (17). GTP-bound Rap1 can activate the kinases Raf-1, B-Raf, and c-Raf, leading into ERK1/2 or p38MAPK pathways. Ras activation by cAMP-GEF is of particular relevance because Ras can activate other kinase cascades such as the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/phosphoinositide-dependent kinase-1 pathway, and it has been demonstrated that Ras is required for TSH-induced mitogenesis in thyroid cells (18). In human and rat thyrocytes, TSH can also stimulate the Gq/phospholipase C cascade (19), and in dog and human thyrocytes, TSH also activates G_i , which partially opposes the stimulation through G_s and is not related to TSH-mediated proliferation (12).

$G\beta\gamma$ has been demonstrated to regulate more than 20 effectors including phospholipases (20), adenylyl cyclases (21), ion channels (22), G protein-coupled receptor kinases (23), and PI3Ks (24). G protein-coupled receptors (GPCRs) regulate through $\beta\gamma$ dimers intracellular signals involved in cell growth and differentiation in different cell types. Through $\beta\gamma$ dimers, GPCRs can activate the MAPK pathway (25–27) and the PI3Ks, a family of lipid kinases involved in multiple biological processes including cell proliferation and survival, cytoskeletal remodeling, and membrane trafficking (28). In thyrocytes, PI3K has a central role in controlling both cell proliferation and differentiation. PI3K is activated in thyrocytes by many growth factors such as insulin/IGF-I, hepatocyte growth factor (HGF), or epidermal growth factor (EGF) (29). Treatment with PI3K inhibitors or the expression of a dominant-negative form of PI3K causes a G1 arrest of rat thyroid cells stimulated to proliferate with TSH (30, 31), and it has been reported that PI3K is required for thyrocytes to proliferate upon TSH stimulation (32). Concerning differentiation of thyroid cells, we have reported that activation of PI3K by IGF-I inhibits the expression of the NIS stimulated by TSH/cAMP (33). In thyroid cells, the role of $G\beta\gamma$ subunits in the transmission of intracellular signals induced by GPCRs remains essentially unknown. This, together with the fact that not all the actions of TSH/TSHR can be explained by cAMP increments, led us to study the involvement of $G\beta\gamma$ dimers in TSH-dependent signaling and the regulation of gene expression in thyroid cells. We have found that TSH activates a cAMP-independent signaling cascade that increases PI3K activity and regulates NIS gene expression.

RESULTS

Overexpression of $G\beta\gamma$ Dimers Inhibits NIS Transcription

Upon TSH binding to its cell surface GPCR, G proteins dissociate into G_α and $G\beta\gamma$ subunits. It is well known that the stimulatory G_α subunit (G_α_s) activates adenylyl cyclase, leading to an increase in cAMP levels that

in turn induce several actions in the thyroid cell, including stimulation of NIS gene expression. The role of the $G\beta\gamma$ subunits released by TSH is not known, but one of the putative effectors of $G\beta\gamma$, the lipid kinase PI3K, has been found by our group to decrease NIS gene expression (33). To initiate the study of $G\beta\gamma$ function in the thyroid cell, we analyzed the effect of $\beta\gamma$ dimers on NIS transcription stimulated by TSH or forskolin, an activator of adenylyl cyclase that increases cAMP levels. For this purpose, PCCI3 cells were transfected with the reporter vector pNIS-2.8 carrying luciferase driven by the NIS promoter and increasing amounts of the expression vectors for $G\beta_1$ and $G\gamma_2$ subunits, FLAG- $G\beta_1$ and HA- $G\gamma_2$. After transfection, cells were maintained for 3 d in starvation medium and then left untreated or treated for another 24 h with TSH or forskolin. Figure 1A shows that overexpression of $G\beta\gamma$ dimers significantly reduces NIS promoter activity stimulated by TSH and forskolin in a dose-dependent manner, indicating that $G\beta\gamma$ signaling interferes with cAMP induction of NIS gene transcription. Immunodetection of one of the tagged components of the $\beta\gamma$ dimer, the FLAG- β_1 protein, is shown. Due to the unspecificity of hemagglutinin (HA) antibodies, the expression of HA- γ_2 was demonstrated by RT-PCR using RNA preparations from an experiment performed under the same conditions (data not shown). We also wanted to study whether $G\beta\gamma$ could regulate endogenous NIS gene expression in PCCI3 cells. For this purpose, PCCI3 cells were transfected either with 5 μg each of FLAG- β_1 and HA- γ_2 or with the same amount of the control vector pcDNA3.1. After 5 d in starvation medium, cells were left untreated or treated with TSH or forskolin for 24 h and then harvested for Western blot analysis of NIS protein levels. The results are shown in Fig. 1B. NIS protein expression induced by TSH or forskolin is clearly less in cells overexpressing $G\beta\gamma$ dimers, compared with cells transfected with the control vector. NIS expression levels were quantified with respect to actin expression from three independent experiments; these normalized levels are graphically shown below a representative Western blot and indicate that the overexpression of $G\beta\gamma$ dimers significantly decreases NIS protein levels induced by TSH ($P < 0.01$) and forskolin ($P < 0.001$).

It should be noted that due to the long half-life of the NIS protein (34), cells must be kept in starvation medium for at least 5 d. Because TSH elicits survival signals in the cell and a prolonged deprivation of the hormone could render the cells apoptotic, we performed a cell cycle profile (data not shown) of cells maintained in starvation medium for up to 6 d to confirm that the results obtained are not due to a high rate of apoptotic cells under the conditions used in these experiments. The data obtained indicate that the percentage of apoptotic cells deprived of TSH for 6 d (sub-G1 = 2.91%) is similar to that of cells growing in control medium containing TSH and serum (sub-G1 = 0.20%). These data confirm that the experimental ap-

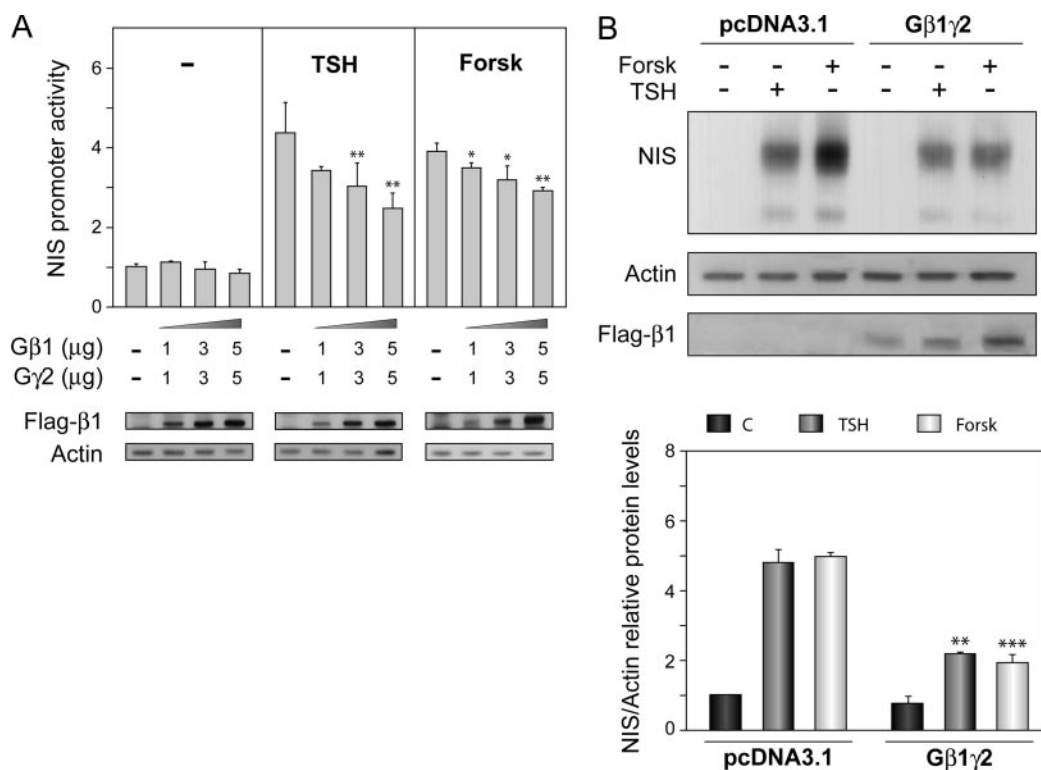


Fig. 1. Regulation of NIS Gene Expression by $G\beta1\gamma2$

A, PCCl3 cells were transfected with 5 μg pNIS-2.8, 0.5 μg pRL-TK, and 0, 1, 3, or 5 μg each of FLAG- $G\beta1$ and HA- $G\gamma2$ and control vector pcDNA3.1 to keep the total amount of transfected DNA constant. After transfection, cells were maintained for 48 h in starvation medium and then left untreated (–) or treated with TSH or forskolin (Forsk) for 24 h. Cells were then harvested for luciferase and Renilla activity determinations. Relative luciferase activity is the value of light units normalized to Renilla activity derived from transfected pRL-TK to correct for transfection efficiency. NIS promoter activity is expressed as the fold induction over the basal levels (equal to 1) of untreated cells not transfected with FLAG- $G\beta1$ and HA- $G\gamma2$. The data represent the mean \pm SD ($n = 3$) of one experiment, which is representative of at least three independent experiments. Statistical significance was evaluated by a two-tailed t test. Differences vs. cells not transfected with FLAG- $G\beta1$ and HA- $G\gamma2$ under the same treatment were considered significant at $P < 0.05$; *, $P < 0.05$; **, $P = 0.01–0.001$. The same protein extracts were used for detection by Western blot analysis of FLAG- $G\beta1$ and actin shown below. B, PCCl3 cells transfected with 10 μg of pcDNA3.1 or 5 μg each of FLAG- $G\beta1$ and HA- $G\gamma2$ expression vectors. After transfection, cells were maintained for 5 d in starvation medium and were then left untreated (–) or treated with TSH or forskolin for 24 h. Cells were then harvested and total protein extracted for immunoblotting with anti-NIS antibody. Anti-Flag antibody was used to control transfection efficiency and anti-actin antibody as a loading control. The panel shows a representative Western blot, and the graphic below is the quantification of NIS protein levels normalized to the loading control. NIS relative protein levels are expressed as the fold induction over the basal levels (equal to 1) of untreated starved cells (–). Values represent the average of three different experiments \pm SD. Statistical significance was evaluated by a two-tailed t test. Differences vs. cells transfected with the control vector under the same treatment were considered significant at $P < 0.05$; **, $P = 0.01–0.001$; ***, $P < 0.001$.

proach is reliable and that apoptosis does not appreciably affect the results obtained.

TSH Induces the Release of $G\beta\gamma$ Dimers that Inhibit NIS But Not Tg Expression

Next we wanted to study whether endogenous $G\beta\gamma$ dimers released in response to TSH could also regulate NIS transcription. To this end, we inhibited $G\beta\gamma$ signaling by using two different $G\beta\gamma$ scavengers, CD8- βARK and pCISG $\alpha\text{T-1}$ ($G\alpha\text{T}$). CD8- βARK is a chimeric molecule containing the extracellular and transmembrane domains of CD8 fused to the carboxyl-terminal domain of β -adrenergic kinase (βARK), which includes

the high-affinity $\beta\gamma$ -binding region of the kinase and thus acts as a $G\beta\gamma$ scavenger (35). The βARK peptide specifically inhibits $G\beta\gamma$ signaling and is a useful tool to distinguish between $G\alpha$ - and $G\beta\gamma$ -dependent pathways (36). $G\alpha\text{T}$ is a vector that expresses the G protein α -subunit of transducin, which also acts as a $\beta\gamma$ scavenger. We discard the possibility of using RNA interference to deplete $G\beta$ and $G\gamma$ subunits expression because it has been reported that complete loss of expression of $G\beta\gamma$ dimers also abolishes $G\alpha$ -mediated pathways (37). Furthermore, the $G\beta$ and $G\gamma$ isoforms expressed in the thyroid and the specific forms released by TSH binding to its receptor are currently unknown. Expression of CD8- βARK produced a dose-

dependent increase in the stimulation of NIS transcription by TSH; however, CD8- β ARK expression did not produce any significant change in the stimulation by forskolin (Fig. 2A, left and middle panels). The same results were obtained when $G\alpha T$ was transfected and cells were treated with TSH (Fig. 2A, right panel) or forskolin (not shown). These findings indicate that $G\beta\gamma$ subunits released after TSH treatment inhibit NIS transcription. As expected, this effect was not observed when cells were treated with forskolin, which directly activates adenylyl cyclase and cAMP production but does not induce $G\beta\gamma$ release. Although it does not affect the interpretation of the results, it is interesting to note that we observe an increase in CD8- β ARK expression levels when the cells are stimulated with TSH or forskolin; this is possibly due to the differences between the expression machinery of quiescent and active cells (38) (Fig. 2A, lower panels). Because it has been reported that the TSHR is able to couple to

members of the four G protein families, it is interesting to determine from which G protein subtype the $G\beta\gamma$ dimers that decrease NIS expression are being released. TSH transmits its signal into the cell mainly through G_s proteins (1), but it has been reported that high nonphysiological doses of TSH can activate the Gq/phospholipase C pathway in rat (39) and human thyroid (40) cells. Despite this high concentration of hormone, the activation of this pathway is always very weak (1, 39). Because we are using hormone concentrations at physiological levels, the Gq family of proteins can be ruled out as a potential $G\beta\gamma$ donor in our experiments.

Coupling of the TSHR to G_i proteins has also been reported (11). Inhibition of G_i signaling using pertussis toxin (PTX) increases cAMP accumulation in response to TSH in human thyroid slices (10) but not in rat PCCl3 (41) or FRTL-5 (42) cells.

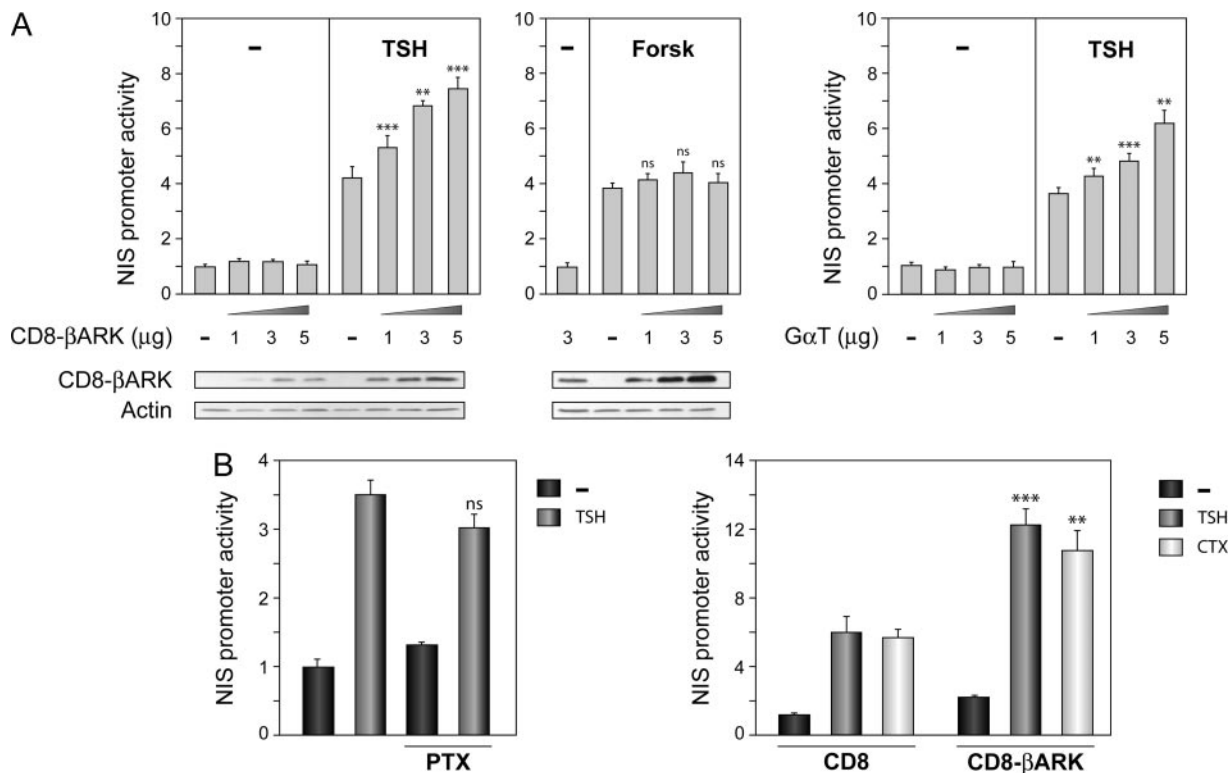


Fig. 2. Effects of $G\beta\gamma$ Sequestration and PTX or CTX Treatment on NIS Gene Expression

A, PCCl3 cells were transfected with 5 μ g pNIS-2.8, 0.5 μ g pRL-TK, and 0, 1, 3, or 5 μ g CD8- β ARK or pCISG α T1 and control vector CD8 to keep the total amount of transfected DNA constant. After transfection, cells were maintained for 48 h in starvation medium and left untreated (-) or treated with TSH or forskolin (Forsk) for 24 h. Cells were then harvested for luciferase and Renilla activity assays; NIS promoter activity was determined as described in the legend of Fig. 1A. Statistical significance was evaluated by a two-tailed *t* test. Differences vs. cells transfected with the control vector under the same treatment were considered significant at $P < 0.05$; ns, not significant ($P > 0.05$); **, $P = 0.01-0.001$; ***, $P < 0.001$. The same protein extracts were used for Western blot detection of CD8- β ARK and actin shown below. B, PCCl3 cells were transfected with 5 μ g pNIS-2.8, 0.5 μ g pRL-TK (both panels), and 5 μ g CD8- β ARK or CD8 control vector (right panel). After transfection, cells were maintained for 48 h in starvation medium and treated with TSH or CTX (right panel) for 24 h. PTX was added 24 h before TSH treatment (left panel). Cells were then harvested for luciferase and Renilla activity assays; NIS promoter activity was determined as described in the legend of Fig. 1A. Statistical significance was evaluated by a two-tailed *t* test. Differences vs. cells in the absence of PTX (left panel) or vs. cells transfected with the control vector under the same treatment (right panel) were considered significant at $P < 0.05$; ns, not significant ($P > 0.05$); **, $P = 0.01-0.001$; ***, $P < 0.001$.

If Gβγ dimers released in response to TSH are coming from the activation of Gi, there should be an increase in the activity of the NIS promoter when Gi coupling to the TSHR is blocked using PTX. We show in Fig. 2B, *left panel*, that TSH promotes an increase in the activity of the NIS promoter, but there is no further significant increase when the cells are stimulated in the presence of PTX. These data indicate that, at least in these cells, TSH is not promoting the activation of Gi proteins at the concentrations used.

We have also performed an experiment using cholera toxin (CTX) as a source of Gβγ dimers specifically released from Gs proteins. Treatment of PCCl3 cells with CTX elicits an increase in the activity of the NIS promoter to a similar extent as TSH. Moreover, CTX treatment of PCCl3 cells transfected with βARK promotes a further and significant increase ($P = 0.01–0.001$) in the activity of the NIS promoter in the same way as in cells stimulated with TSH (Fig. 2B, *right panel*). Together, these results show that Gβγ dimers that decrease NIS promoter activation in response to TSH are released upon Gs protein activation.

To analyze how Gβγ sequestration influences endogenous NIS protein expression, PCCl3 cells were

transfected with CD8-βARK or a vector carrying CD8 only. After 5 d in starvation medium, cells were left untreated or treated with TSH or forskolin for 24 h and then harvested for Western blot analysis. Figure 3A shows that induction of NIS protein levels by TSH in cells expressing CD8-βARK is significantly ($P = 0.01–0.001$) higher than in cells treated with the control CD8 vector. This difference was not found when cells were treated with forskolin; *i.e.* NIS protein levels were similar in cells transfected with CD8-βARK and with the CD8-vector. Different results were obtained when Tg protein levels were analyzed. Tg protein expression was induced by TSH and forskolin to the same extent, and both effects were not significantly altered by CD8-βARK transfection. The induction levels were quantified with respect to actin or Sp1 expression and are shown below a representative Western blot. We also analyzed the activity of the Tg promoter in cells expressing CD8-βARK. The results shown in Fig. 3B indicate that Gβγ subunits released by TSH do not significantly inhibit Tg transcription.

Thus, Gβγ dimers released in response to TSH inhibit NIS gene expression but do not interfere with Tg expression, demonstrating that signaling pathways

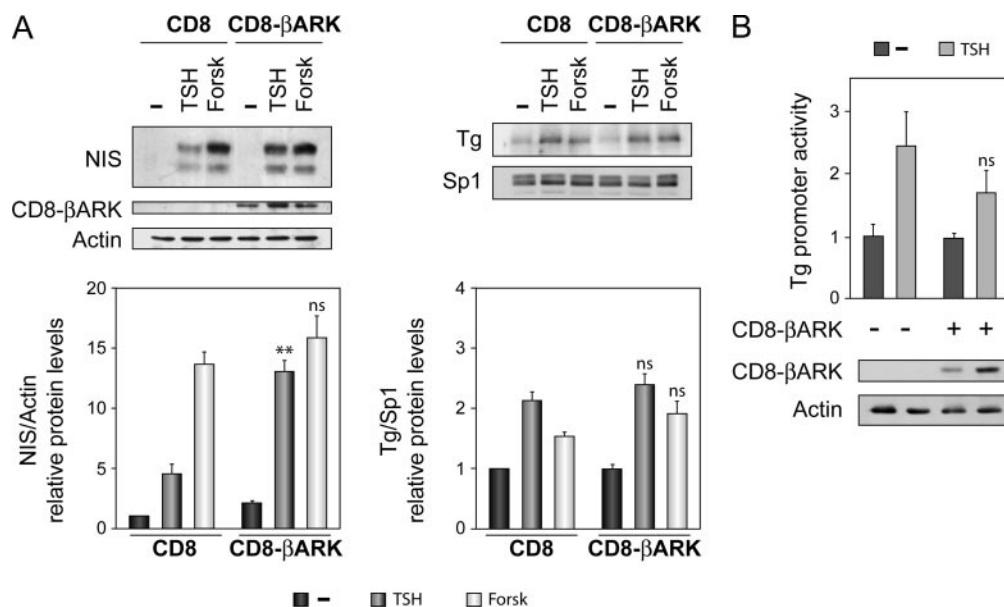


Fig. 3. Gβγ Effect on NIS and Tg Endogenous Protein Levels

A, PCCl3 cells were transfected with 5 μg control CD8 vector or CD8-βARK. Transfected cells were maintained for 5 d in starvation medium and were then left untreated (–) or treated with TSH or forskolin for 24 h. Cells were then harvested and total protein extracted for Western blotting with anti-NIS and anti-Tg antibodies. The immunoblot with anti-CD8 shows CD8-βARK expression and was used to control transfection efficiency. Membranes were hybridized with anti-actin or anti-Sp1 antibodies as loading controls. The *panels* show a representative Western blot and the graphics below show the quantification of NIS or Tg protein levels normalized to the respective loading control. Relative NIS and Tg protein levels are expressed as the fold induction over the basal levels (equal to 1) of untreated, CD8-transfected cells (–). Values represent the average of three different experiments ± SD. Statistical significance was evaluated by a two-tailed *t* test. Differences vs. cells transfected with the control vector under the same treatment were considered significant at $P < 0.05$; ns, not significant ($P > 0.05$); **, $P = 0.01–0.001$. B, PCCl3 cells were transfected with 3 μg hTGenh/prm-Luc, 0.5 μg pRL-TK, and 5 μg CD8-βARK or CD8. After transfection, cells were maintained for 48 h in starvation medium and were then left untreated or treated with TSH for 24 h. Cells were then harvested for luciferase and Renilla activity assays, and Tg promoter activity was determined as described for NIS promoter activity in the legend of Fig. 1A. Statistical significance was evaluated by a two-tailed *t* test. Differences between TSH-treated CD8-βARK transfected cells and TSH-treated cells transfected with the control vector were not significant (ns, $P > 0.05$).

downstream from $G\beta\gamma$ differentially regulate thyroid gene expression. This effect was not due to variations in cAMP levels, because overexpression or sequestration of $G\beta\gamma$ dimers did not have any apparent effect on the fold induction of cAMP in response to TSH (Fig. 4A). The absence of apparent changes in cAMP induction levels was also demonstrated transfecting PCCl3 cells with a luciferase reporter construct containing three cAMP response elements (CRE) in tandem (Fig. 4B).

TSH Induces Akt Phosphorylation through PI3K

PI3K has been reported to be one of the main targets of $G\beta\gamma$ signaling initiated by GPCRs. Because we found in a previous study that PI3K down-regulates NIS gene expression (33), we decided to study whether PI3K is an effector of $G\beta\gamma$ subunits in thyroid cells, able to inhibit NIS expression. First of all, we analyzed PI3K activation by TSH, forskolin, and IGF-I in PCCl3 cells. To this end, we analyzed by Western blot the phosphorylation level of the PI3K target Akt. Figure 5A shows that TSH induces Akt phosphorylation in a time-dependent manner, with a maximum stimulation between 30 min and 1 h. Forskolin also increased phosphorylated Akt (pAkt) levels although to a lesser extent than TSH. pAkt levels after 15 min of IGF-I treatment are shown as a positive control and indicate that Akt phosphorylation in response to TSH, although clearly detectable, is not as high as the strong signal elicited by IGF-I. Induction of Akt phosphorylation by either TSH or forskolin, at short times (30 min) or for a longer period of 24 h, was inhibited by LY294002 (LY) (Fig. 5B), indicating that PI3K is mediating Akt phosphorylation in response to TSH and forskolin. Total Akt levels were not altered among the different experimental conditions, indicating that changes in the phosphorylation status of Akt are not due to an increase in total Akt protein.

It has been suggested that some of the effects observed in thyroid cells in response to TSH, such as PI3K/Akt activation, could be due to growth factor contamination of the TSH preparation. Experiments shown up to now in the present study were performed using bovine pituitary TSH. To rule out the possibility of growth factor contamination, we analyzed the effect of human recombinant TSH (hrTSH) both on NIS transcription (Fig. 5C) and on Akt phosphorylation (Fig. 5D). NIS promoter activity was similar in cells treated with hrTSH and in cells treated with bovine TSH. In addition, hrTSH also stimulates Akt phosphorylation in a time-dependent manner. We confirmed that the increase in pAkt levels induced by hrTSH is due to PI3K activation using two different PI3K inhibitors: LY294002 (LY), at concentrations ranging from 1–20 μM , and wortmannin (Wort), at concentrations from 25–100 nM. Western blot analyses of pAkt and total Akt levels are shown in Fig. 5E.

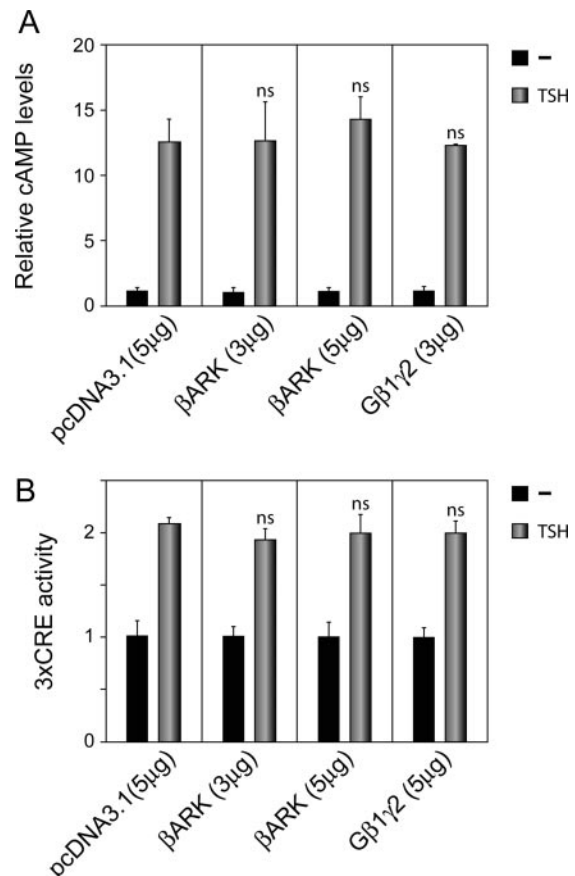


Fig. 4. Effect of $G\beta\gamma$ on TSH-Induced cAMP Production

A, PCCl3 cells were transfected with 5 μg pcDNA3.1, 3 or 5 μg CD8- βARK , or 3 μg of both FLAG- $G\beta 1$ and HA- $G\gamma 2$ expression vectors. Transfected cells were maintained for 48 h in starvation medium and treated with 0.5 mM IBMX for 30 min, followed by 1 nM TSH treatment for 1 h. Cells were then harvested for determination of cAMP levels. cAMP induction in response to TSH is shown as the fold induction over basal levels (equal to 1) of starved cells (–). The data represent the mean \pm SD ($n = 3$) of one experiment, which is representative of three independent experiments. Statistical significance was evaluated by a two-tailed t test. Differences of TSH-treated, expression vector-transfected cells vs. cells transfected with the control vector and treated with TSH were not significant (ns, $P > 0.05$). B, PCCl3 cells were transfected with 5 μg 3xCRE-LUC reporter, 0.5 μg pRL-TK, 5 μg pcDNA3.1, and 3 or 5 μg CD8- βARK or 5 μg of both FLAG- $G\beta 1$ and HA- $G\gamma 2$ expression vectors. After transfection, cells were maintained for 48 h in starvation medium and were then left untreated or treated with TSH for 24 h. Cells were then harvested for luciferase and Renilla activity assays. Relative luciferase activity is the value of light units normalized to Renilla activity derived from transfected pRL-TK to correct for transfection efficiency. 3xCRE-LUC activity is expressed as the fold induction over basal levels (equal to 1) of starved cells (–). The data represent the mean \pm SD ($n = 3$) of one experiment, which is representative of three independent experiments. Statistical significance was evaluated by a two-tailed t test. Differences vs. cells transfected with the control vector were not significant (ns, $P > 0.05$).

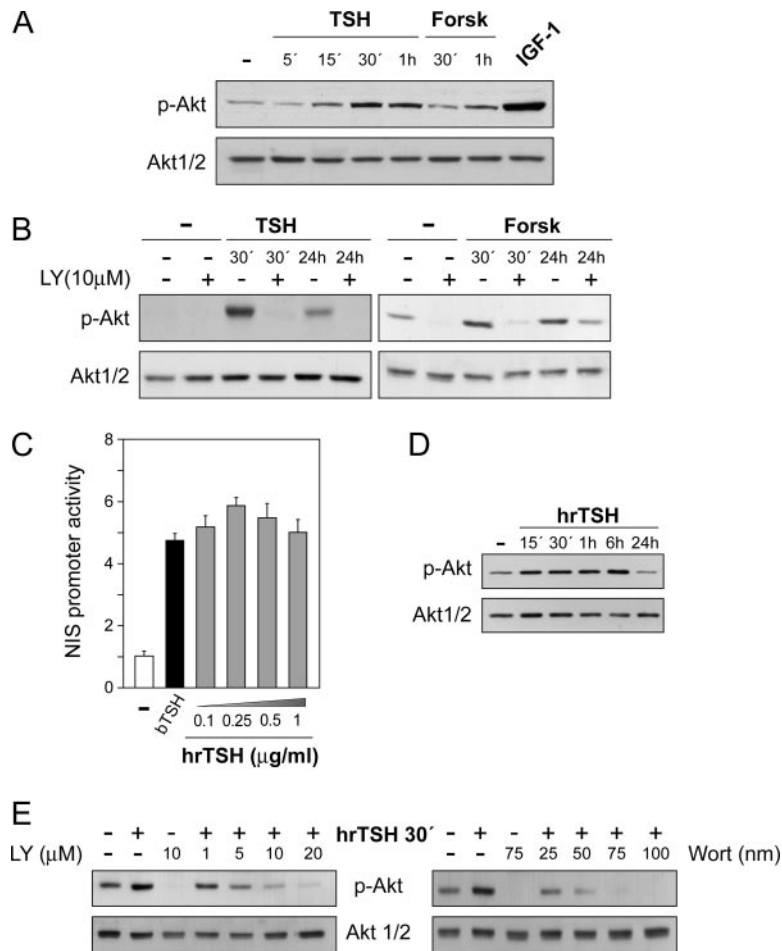


Fig. 5. Activation of the PI3K/Akt Pathway by TSH, Forskolin, and IGF-I Treatment

PCCl3 cells were maintained for 48 h in starvation medium and then treated with bovine TSH (A–C), forskolin (Forsk) (A and B), or hrTSH (C–E) for the periods of time indicated or with IGF-I for 15 min (A). The PI3K inhibitors LY294002 (LY) (B and E) or wortmannin (Wort) (E) were added at the indicated final concentrations 1 h before the different treatments. After treatment, cells were harvested for total protein preparation and pAkt detection by Western blot. As a loading control, membranes were hybridized with anti-total Akt antibodies. Western blots representative of at least three independent experiments are shown. C, PCCl3 cells were transfected with 5 μ g pNIS-2.8 and 0.5 μ g pRL-TK. After transfection, cells were maintained for 48 h in starvation medium and were then left untreated or treated with 1 nM bovine TSH (bTSH) or hrTSH at the concentrations indicated for 24 h. Cells were then harvested for luciferase and Renilla activity determinations. NIS promoter activity is expressed as the fold induction over basal levels (equal to 1) of untreated cells (–), and calculated as explained in the legend of Fig. 1. The data represent the mean \pm SD ($n = 3$) of one experiment, representative of at least three independent experiments.

In view of these results, it can be concluded that TSH stimulates Akt phosphorylation in PCCl3 cells through PI3K activation.

TSH Induces Akt Phosphorylation in a cAMP-Independent Manner

Stimulation of PI3K by TSH in thyroid cells and the involvement of cAMP in this signaling pathway are controversial. The results reported up to date show that PI3K activation by TSH depends on the thyroid cell type studied. When this pathway is active, it has been suggested that cAMP is mediating the stimulation of PI3K by TSH. In the present study, we wanted to analyze whether cAMP is mediating the signal ini-

tiated by TSH to activate PI3K in PCCl3 cells. For this purpose, we used two different inhibitors that act at different levels in the cAMP signaling pathway. The first one, H89, inhibits the activity of PKA, one of the most important targets of cAMP. We have analyzed the effect of H89 on the phosphorylation of Akt by TSH in PCCl3 cells. The results are shown in Fig. 6A. Pretreatment with H89 increases basal pAkt levels as reported (43) and does not significantly affect TSH and forskolin stimulation of Akt phosphorylation. The induction levels were quantified with respect to total Akt expression and are shown below a representative Western blot.

The second inhibitor used was adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer, triethylammo-

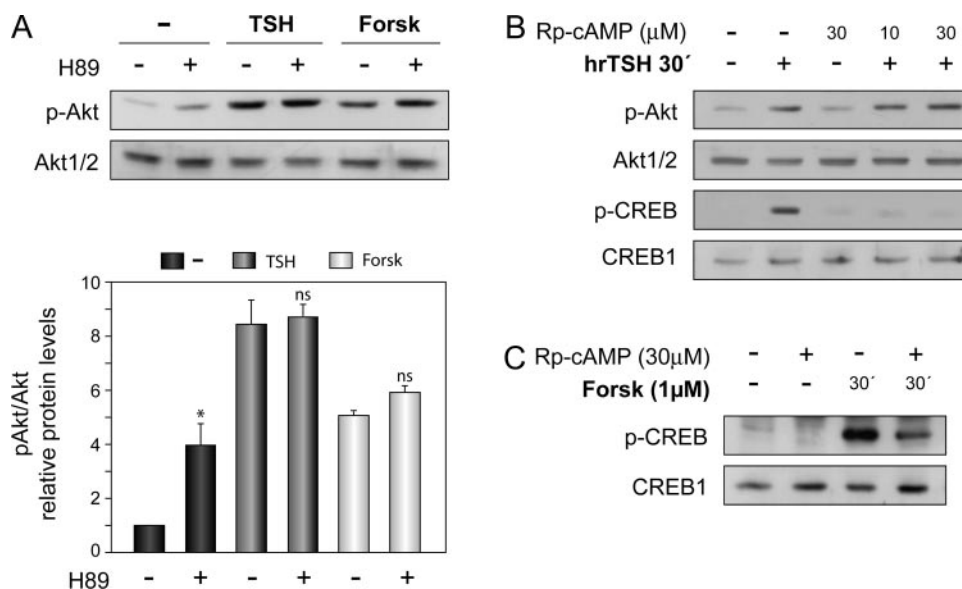


Fig. 6. Role of cAMP and PKA in TSH- and Forskolin-Induced Akt Phosphorylation

PCCl3 cells were maintained for 72 h in starvation medium and then left untreated or treated with TSH or forskolin (Forsk) for 30 min. A, The PKA inhibitor H89 was added at 10 μ M 1 h before TSH or forskolin treatment. The *panel* shows a representative Western blot, and the graphic *below* shows the quantification of pAkt protein levels normalized to Akt1/2 protein levels. The pAkt relative protein levels are expressed as the fold induction over basal levels (equal to 1) of starved cells (-). Values represent the average of three different experiments \pm SD. Statistical significance was evaluated by a two-tailed *t* test. Differences between similarly treated cells in the absence or presence of H89 were considered significant at $P < 0.05$; ns, not significant ($P > 0.05$); *, $P < 0.05$. B, Different concentrations of the cAMP competitor Rp-cAMP were added 1 h before hrTSH treatment for 30 min. C, Rp-cAMP (30 μ M) was added 1 h before treatment with 1 μ M forskolin for 30 min. The immunoblots were probed with anti-pAkt, Akt1/2, pCREB, and CREB1 as indicated.

nium salt (Rp-cAMP), a specific competitor of cAMP for its binding site that avoids cAMP activation of the different cAMP targets, including PKA. Cells were treated with 10 and 30 μ M Rp-cAMP and then treated with TSH for 30 min. The presence of Rp-cAMP does not prevent stimulation of Akt phosphorylation by hrTSH at the different concentrations used (Fig. 6B). To demonstrate that Rp-cAMP is active in these conditions, we analyzed the phosphorylation state of CRE-binding protein (CREB), a transcription factor that is phosphorylated in response to cAMP increases. The results show that both TSH- and forskolin-induced CREB phosphorylation is strongly diminished in the presence of 30 μ M Rp-cAMP (Fig. 6, B and C, respectively), indicating that Rp-cAMP at this concentration is inhibiting cAMP signaling. Taken together, these results demonstrate that cAMP does not completely mediate TSH-dependent stimulation of Akt phosphorylation in PCCl3 cells.

$G\beta\gamma$ Subunits Released by TSH Action Stimulate Akt Phosphorylation

The results reported above indicate that TSH can activate the PI3K pathway in a cAMP-independent manner. In view of these findings, the question arises whether PI3K is an effector of $G\beta\gamma$ dimers released by the action of TSH in PCCl3 cells. To answer that question, we analyzed the effect of $\beta\gamma$ overexpression or

sequestration on pAkt levels induced by TSH, forskolin, or IGF-I. Figure 7A shows that overexpression of $\beta\gamma$ subunits induces phosphorylation of Akt. On the other hand, transfection of CD8- β ARK inhibits Akt phosphorylation induced by TSH (Fig. 7B). As expected, this effect was not observed in cells treated with forskolin or after treatment with IGF-I, a growth factor that mediates PI3K/Akt activation through its binding to tyrosine kinase receptors not coupled to G proteins (Fig. 7B). In conclusion, these results indicate that TSH can stimulate Akt phosphorylation through the release of $G\beta\gamma$ dimers.

$G\beta\gamma$ Release Induced by TSH Reduces Pax8 Binding to the NIS Promoter

Our data clearly show that $G\beta\gamma$ dimers repress NIS promoter activity, and therefore, we explored the mechanism involved in this inhibition. We focused our attention on the transcription factor Pax8 because it is the main mediator of NIS transcription (6). First we determined Pax8 protein levels in PCCl3 cells transfected with the CD8 expression vector, as a control, or with the CD8- β ARK expression vector. As shown in Fig. 8A, TSH ($P = 0.01$ – 0.001) and forskolin ($P < 0.001$) treatment significantly increased Pax8 protein levels compared with untreated cells. Sequestration of $G\beta\gamma$ dimers by expression of CD8- β ARK did not sig-

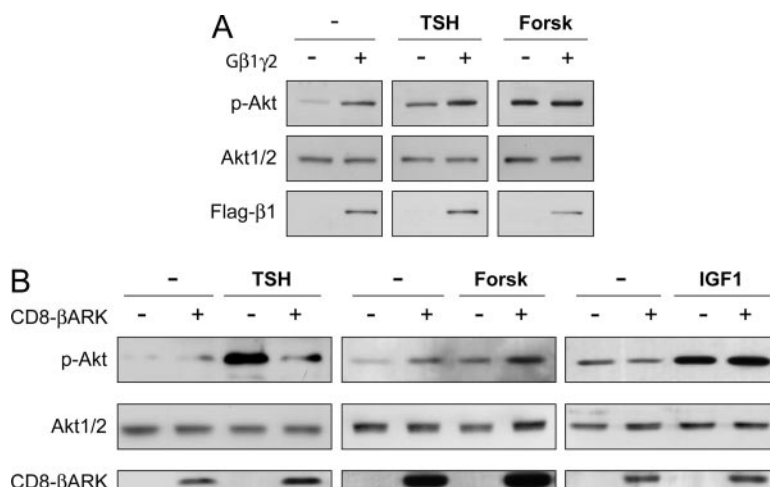


Fig. 7. $G\beta\gamma$ Effect on Akt Phosphorylation

PCCl3 cells were transfected with 5 μ g each of FLAG- $G\beta 1$ and HA- $G\gamma 2$ or with 10 μ g pcDNA3.1 (A) or with 5 μ g CD8- β ARK or CD8 control vector (B). After transfection, cells were maintained for 48 h in starvation medium and were then left untreated or treated with TSH or forskolin (Forsk) for 30 min (A and B) or with IGF-I for 15 min (B). Cells were then harvested for total protein extraction and pAkt detection by Western blot. Membranes were hybridized with anti-FLAG (A) or anti-CD8 (B) antibodies to show FLAG- $G\beta 1$ and CD8- β ARK expression, respectively. Anti-Akt1/2 detection was used as a loading control. Western blots representative of at least three independent experiments are shown.

nificantly affect Pax8 protein levels compared with the cells transfected with the control vector.

Because $G\beta\gamma$ dimer sequestration did not modify Pax8 protein levels, we determined whether under these conditions Pax8 binding to its site within the NUE in response to TSH or forskolin is changed. To this end, PCCl3 cells were transfected with the CD8 or the CD8- β ARK expression vectors, maintained for 3 d in starvation medium, and were then left untreated or treated for 24 h with TSH or forskolin. Nuclear extracts were obtained, and Pax8 binding to its site in the NIS promoter was determined by EMSA. The results show that in the control CD8 cells, the Pax8/DNA complex increases in response to both TSH (Fig. 8B, compare lanes 2 and 3) and forskolin (Fig. 8C, compare lanes 2 and 3). Interestingly, when $G\beta\gamma$ dimers were sequestered by β ARK expression, an increase in the Pax8/DNA complex was observed only in cells treated with TSH (Fig. 8B, compare lanes 3 and 8) but not with forskolin (Fig. 8C, compare lanes 3 and 8). The same results were obtained when PI3K was inhibited by treatment of control CD8 cells with LY294002 (LY); thus, we see an increase in the Pax8/DNA complex in response to TSH (Fig. 8B, compare lane 3 with 12) but no modification in response to forskolin (Fig. 8C, compare lane 3 with 12). In all cases, the specificity of the complex formation was determined by competition with related (Fig. 8, B and C, lanes 4, 9, and 13) or unrelated (Fig. 8, B and C, lanes 5, 10, and 14) oligonucleotides. The complex was also competed with an anti-Pax8 antibody generated against the Pax8 DNA-binding site (Fig. 8, B and C, lanes 6), demonstrating that Pax8 protein forms part of the complex. These data clearly demonstrate that the molecular mechanism involved in NIS repression by $G\beta\gamma$ dimers takes

place at the transcriptional level, affecting Pax8 binding to the NUE. This effect occurs only when cells are treated with TSH but not with forskolin, which does not induce $G\beta\gamma$ release, and is reverted when PI3K is inhibited. This confirms that $G\beta\gamma$ dimers released upon TSH binding to its receptor are mediating a decrease of Pax8 binding to the NIS promoter that is transmitted by the PI3K pathway.

The effect of $G\beta\gamma$ dimers on Pax8 localization was studied by immunofluorescence (Fig. 9). In cells cultured in the absence of TSH for 2 d, Pax8 is barely expressed. When these cells are treated with TSH for 24 h, Pax8 expression is increased and is predominantly located in the nucleus and not observed in the cytoplasm. The transfection with $G\beta 1$ and $G\gamma 2$ subunits expression vectors induces a significant exclusion of Pax8 from the nucleus to the cytoplasm, an effect that was impaired by LY294002 pretreatment. $G\beta\gamma$ sequestration by β ARK transfection retains Pax8 into the nucleus.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate a role for $G\beta\gamma$ dimers in TSH-dependent signaling in thyroid cells. $G\beta\gamma$ dimers released after TSH treatment lead to PI3K/Akt activation and regulate NIS gene expression in PCCl3 cells. In a previous study (33), we reported an increase of TSH-dependent induction of NIS gene expression in the presence of the PI3K inhibitor LY294002. Those results suggested the existence of a pathway from TSH to PI3K that inhibits NIS gene expression. Here, we confirm this suggestion specifically

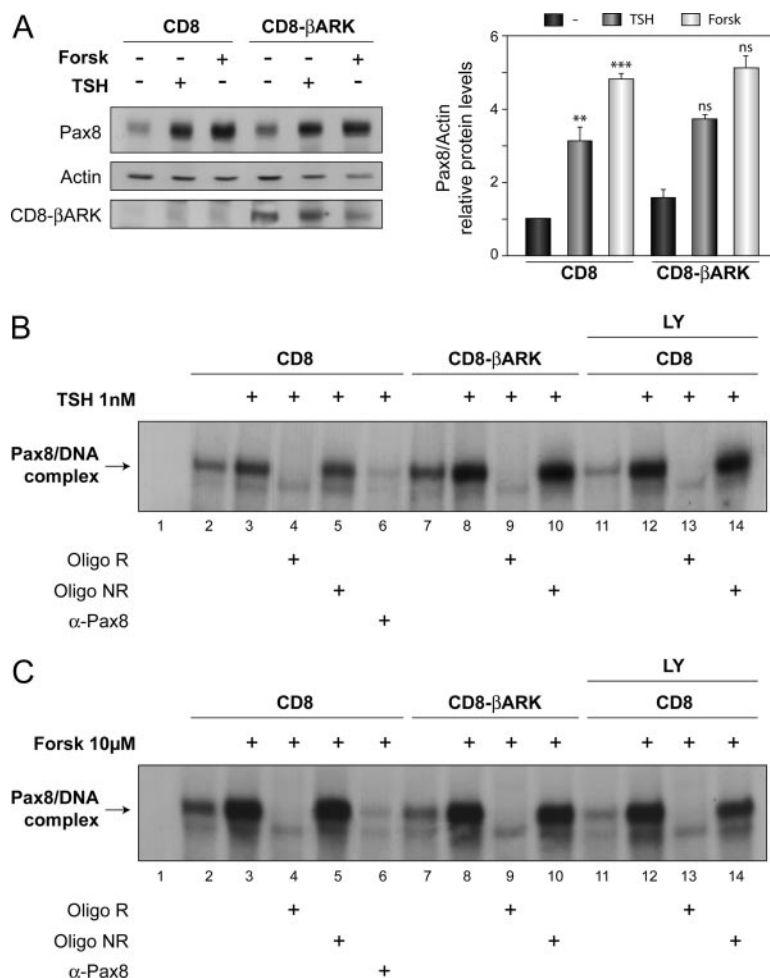


Fig. 8. Regulation of Pax8 Binding to Its Element within the NUE

A, PCC13 cells were transfected with 5 μ g CD8 or CD8- β ARK expression vectors, maintained for 3 d in starvation medium, and then left untreated or treated with TSH or forskolin (Forsk) for 24 h. Cells were then harvested and total protein extracted for Western blotting with Pax8 antibody. The immunoblot with anti-CD8 shows CD8- β ARK protein levels as a control for transfection efficiency. Membranes were hybridized with anti-actin antibody as a loading control. The *panel* shows a representative Western blot, and the graphic to the right shows the quantification of Pax8 protein levels normalized to the loading control. Relative Pax8 protein levels are expressed as the fold induction over the basal levels (equal to 1) of starved cells transfected with the CD8 expression vector (-). Values represent the average of three different experiments \pm SD. Statistical significance was evaluated by a two-tailed *t* test. Both in CD8-transfected cells and in CD8- β ARK-transfected cells, TSH and forskolin significantly increase Pax8 protein levels with respect to untreated cells; **, $P = 0.01-0.001$; ***, $P < 0.001$, respectively, only indicated for CD8-transfected cells. Differences between CD8- β ARK-transfected cells and cells transfected with the control vector under the same treatment were not significant (ns, $P > 0.05$). B and C, Nuclear extracts from PCCL3 cells transfected and treated as described in A in the presence or absence of 10 μ M LY294002 (LY) were obtained for EMSAs with 32 P-labeled oligonucleotides corresponding to the Pax8-binding site (site PB) derived from the NIS Upstream Enhancer (6). The probe was incubated without (lane 1) or with 7 μ g nuclear extracts (lanes 2–14) from cells treated as described above and as indicated in the figures. Competition was performed with a 100-fold molar excess of unlabeled related (Oligo R; lanes 4, 9, and 13) or unrelated (Oligo NR; lanes 5, 10, and 14) oligonucleotides as well as with an anti-Pax8 antibody (α -Pax8; lane 6).

impairing $G\beta\gamma$ dimers signaling by using two different $G\beta\gamma$ scavengers, CD8- β ARK and $G\alpha T$. Expression of these molecules results in a further activation of the NIS promoter elicited by TSH demonstrating unequivocally a role of $G\beta\gamma$.

Most of our study has been performed with the specific scavenger CD8- β ARK, a construct that expresses a chimeric protein containing not only the C-terminal domain of the β ARK1 protein, where the $G\beta\gamma$ binding do-

main is located but also the extracellular and transmembrane domains of the CD8 protein that is targeted to the membrane where it is able to interact with and sequester $G\beta\gamma$ dimers, making it an effective and specific scavenger (35). It has been clearly established that the C-terminal β ARK peptide discriminates between $G\beta\gamma$ - and $G\alpha$ -mediated pathways (35, 36, 44, 45). The specificity of the $G\alpha T$ as a $G\beta\gamma$ scavenger has also been previously tested (44–48).

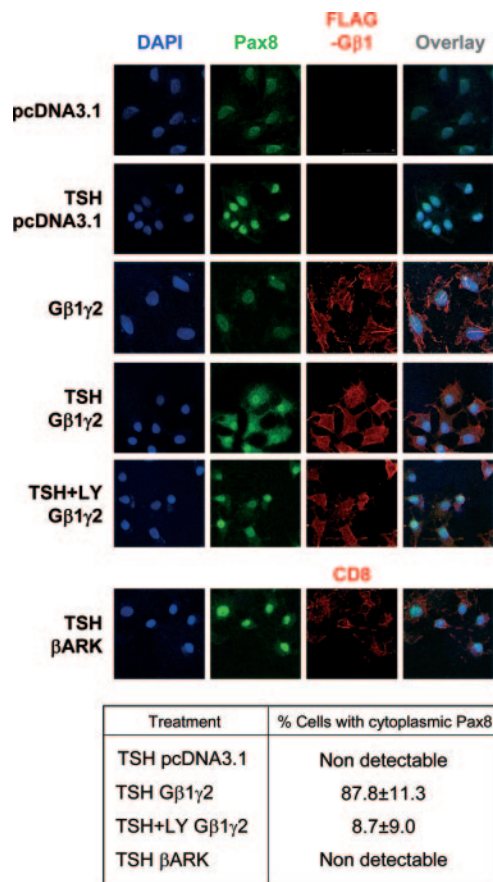


Fig. 9. $G\beta\gamma$ Effect on Pax8 Localization

Top panel. Representative immunofluorescence assay. PCC13 cells were seeded on coverslips and transfected with 10 μ g pcDNA3.1, 5 μ g each of FLAG- $\beta 1$ and HA- $\gamma 2$, or 5 μ g CD8- β ARK. After 48 h in starvation medium, cells were left untreated or treated with TSH for 24 h. LY294002 (LY) inhibitor was added 1 h before TSH addition. After treatment, cells were fixed, blocked, and incubated with Pax8 and FLAG or CD8 antibodies followed by Alexa 488 and TexasRed 546 secondary antibodies immunostaining. Cells were then mounted on Vectashield containing DAPI and observed under a confocal microscope using a $\times 63$ magnification objective. DAPI, Pax8, FLAG, CD8, and the merged pictures are shown. A representative group of cells from three independent experiments is presented. A 0- to 50- μ m scale is shown in the first picture of the third column. *Bottom panel.* Quantitative analysis (%) of successfully transfected cells that present a consistent Pax8 cytoplasmic localization. Five different fields were randomly chosen from each experiment. The data are the mean \pm SD of three independent experiments.

This effect is not observed in cells treated with the adenylyl cyclase activator forskolin, indicating that the $G\beta\gamma$ dimers coupled to the TSHR are activating signaling pathways leading to NIS gene repression. Although overexpressed $G\beta\gamma$ could bind to $G\alpha_s$, thereby inactivating it and decreasing cAMP levels, we believe that the effects observed are not due to a decrease in cAMP because this inhibitory effect was also observed in forskolin-treated cells; forskolin acts downstream of

$G\alpha_s$ and directly activates adenylyl cyclase. Thus, inactivation of $G\alpha_s$ subunits by $G\beta\gamma$ overexpression should not interfere with forskolin induction of cAMP elevation. In addition, the induction levels of cAMP in response to TSH are the same in cells overexpressing $G\beta\gamma$ as in cells expressing the scavenger β ARK. Thus, we can conclude that $G\beta\gamma$ inhibition of TSH-induced NIS transcription is due to a direct action of $G\beta\gamma$ and not to decreased cAMP levels.

Although much work has been done to study the signaling pathways involved in thyroid cell proliferation, little is known concerning signaling cascades that regulate thyroid cell differentiation other than the cAMP/PKA pathway. Other factors such as insulin/IGF-I have been reported to increase TSH stimulation of Tg, TPO, and TSHR expression (49–51), but as we reported recently, NIS gene expression is inhibited by insulin/IGF-I, and this effect is mediated in part by PI3K (33). Thus, PI3K appears to regulate Tg and NIS gene expression in different ways.

$G\beta\gamma$ dimers have been reported to regulate a large number of effectors, including PI3Ks (24). PI3Ks constitute a large family of lipid kinases that have been divided into three classes. They phosphorylate the D3 position of the inositol ring of phosphoinositides, generating phospholipids that are involved in cellular functions including chemotaxis, differentiation, glucose homeostasis, proliferation, survival, and trafficking (28, 52). These lipid kinases are under tight control of cell surface receptors, including receptor tyrosine kinases and GPCRs (53). The most studied PI3Ks are those belonging to class I. Class IA enzymes consist of a p110 catalytic subunit complexed to a regulatory subunit, p85, and signal downstream of tyrosine kinases and Ras, although an activation of p110 β by GPCRs through $G\beta\gamma$ dimers has been reported (54). Class IB PI3K consists of the p110 γ catalytic subunit complexed to the p101 regulatory subunit and signals downstream of GPCRs and Ras. GPCRs activate PI3K γ and PI3K β through direct interaction with $G\beta\gamma$. The results we present here indicate that TSH can activate the PI3K/Akt pathway through $G\beta\gamma$ dimers and that this pathway is interfering with the activation of NIS gene expression in thyroid cells by cAMP. In the thyroid cell, PI3K plays a critical role in controlling cell proliferation (30, 31). Several growth factors have been shown to activate the PI3K pathway (29), and inhibition of PI3K activity leads to a G0/G1 arrest of thyroid cells (30, 31). Depending on the cell type, opposing results have been reported concerning the activation of PI3K/Akt pathway by TSH (29). It has been suggested that PI3K/Akt activation by TSH could be due to contaminants of the TSH preparation. To address this question we used hrTSH and we observed that hrTSH induces Akt phosphorylation in a PI3K-dependent manner. In addition, Akt phosphorylation induced by TSH was abolished when cells were incubated in the presence of an anti-TSHR antibody (data not shown). Taken together, these data unequivocally demonstrate that TSH increases Akt phosphorylation at 10–15 min,

reaching its maximal effect at 30–60 min. At earlier time points, almost undetectable changes can be observed in our experimental conditions (data not shown), which considerably differ from those used by Lou *et al.* (55). These authors observed a decrease in Akt phosphorylation after TSH treatment, but cells were cultured in the presence of insulin, which strongly activates the PI3K pathway. Furthermore, cell cultures were deprived of serum and TSH for only 16 h, whereas our starvation period is much longer (2–3 d), and therefore, basal pAkt levels are lower. Thus, the induction of Akt phosphorylation observed in our experiments is due only to TSH action. This activation does not appear to be mediated by PKA and cAMP signaling, because pretreatment with H89 (an inhibitor of PKA activity) or Rp-cAMP (an analog competitor of cAMP that inhibits signaling downstream of cAMP, including PKA) does not affect TSH induction of Akt phosphorylation. We found that forskolin is also able to induce PI3K-dependent Akt phosphorylation but to a much lesser extent than TSH. In view of these results, we cannot rule out the existence of a cAMP-PKA/PI3K pathway in PCCl3 cells, as has been demonstrated in FRTL5 cells (56), but it does not seem to be the only signaling pathway promoting stimulation of PI3K by TSH. No doubt, both PKA and PI3K are playing crucial roles in the regulation of thyroid cell proliferation and differentiation, and the reported opposite effects of PKA on PI3K activity reflect the complexity of the signaling cascades and the processes these kinases are controlling. Much work needs to be done to unravel whether this complex regulation is explained by different PKA and PI3K isoforms. Thus, our results describe a new signaling pathway leading to PI3K activation in response to TSH, involving $G\beta\gamma$ dimers and occurring in a cAMP-independent manner. This new pathway regulates thyroid differentiation and thus thyroid function.

To further address the mechanism of inhibition of NIS gene expression by $G\beta\gamma$, we analyzed the levels of Pax8 and its binding to the rat NIS promoter. Pax8 is the main transcription factor regulating NIS gene expression. It has been demonstrated that Pax8 binding to this region is required for the TSH/cAMP induction of NIS transcription. Here we show that TSH induction of Pax8 binding to the NIS promoter increases when $G\beta\gamma$ signaling is inhibited by overexpression of $G\beta\gamma$ scavengers. On the other hand, $G\beta\gamma$ sequestration does not affect the binding of Pax8 induced by forskolin, reflecting the results obtained when promoter activity was analyzed. The amount of Pax8 bound to the NIS promoter in cells treated with TSH also increases when PI3K is inhibited by LY294002, indicating that signals leading to PI3K activation diminish Pax8 binding activity to the NIS promoter. We can conclude that the release of $G\beta\gamma$ dimers induced by TSH activates PI3K in PCCl3 cells and down-regulates NIS transcription by decreasing Pax8 binding to the NIS promoter.

The mechanism involved in the regulation of Pax8 binding to NIS promoter is still not well defined. Pax8 is a phosphoprotein whose phosphorylation seems to be not dependent on cAMP pathway activation (57). However, the Pax8 activation domain is dependent upon the catalytic subunit of the PKA and it has been proposed that this dependence involves a hypothetical adaptor that is targeted by PKA and interacts with the activating domain of Pax8 (58). Concerning the regulation of Pax8 binding by other kinases, such as PI3K, the only data reported so far are the ones described here. We think that the situation could be similar to the one reported for cAMP/PKA, because Pax8 phosphorylation seems to be independent of PI3K activation (our unpublished data). In fact, our preliminary results suggest that the inhibition of Pax8 binding to the NIS promoter by PI3K/Akt is mediated by the interaction of Pax8 with the transcription factor FoxO1, a forkhead factor activated by the IGF-I/PI3K/Akt pathway (59). These preliminary results raise interesting questions regarding the regulation of Pax8 activity. Along with this line, we report here that Pax8 is excluded from the nucleus when $G\beta\gamma$ dimers are overexpressed, and this effect is partly impaired when PI3K is inhibited. This is an interesting observation that remains to be studied in detail, although we hypothesize that FoxO1 could also be involved, because it has been described that FoxO1 is excluded from the nucleus after phosphorylation by PI3K (60). The new pathway described here does not seem to be involved in the regulation of expression of Tg, another thyroid differentiation marker. Like NIS expression, Tg gene expression is stimulated by TSH/cAMP, but contrary to what happens for NIS, Pax8 is not the main transcription factor regulating the expression of Tg. Moreover, IGF-I differentially regulates TSH-induced Tg (49) and NIS (33) expression. Thus, it would be expected that a decrease in Pax8 DNA binding activity and/or PI3K activation would not affect the expression of the Tg gene.

In view of the results presented here, we can conclude that TSH activates the PI3K/Akt pathway not only in a cAMP-dependent manner, as was reported previously (30, 61), but also by a cAMP-independent mechanism that involves $G\beta\gamma$ subunits. We demonstrate that $G\beta\gamma$ subunits induce Akt phosphorylation and interfere with NIS gene expression induced by TSH and forskolin. Down-regulation of NIS gene expression by $G\beta\gamma$ dimers occurs at the transcriptional level, because $G\beta\gamma$ dimers reduce the ability of Pax8 to bind the NIS promoter and induce the exclusion of Pax8 from the nucleus. These results demonstrate a functional role for $G\beta\gamma$ dimers in thyroid cell differentiation, and more studies are needed to clarify the mechanism underlying the inhibition of Pax8 DNA binding and its exclusion from the nucleus. On the other hand, the diversity of signaling pathways activating PI3K in the thyroid cell (summarized in Fig. 10) suggests the involvement of different PI3K subtypes. Future studies will be focused on the identification of

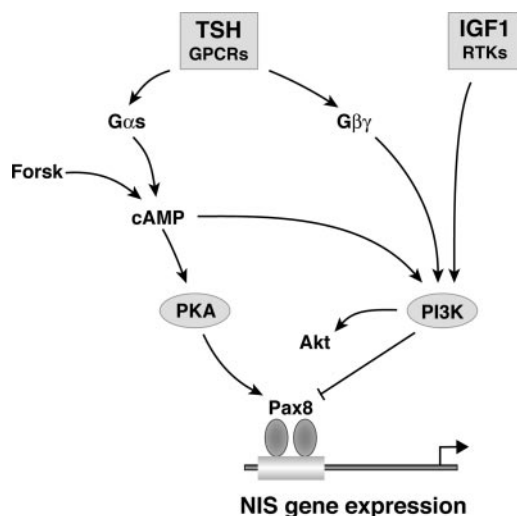


Fig. 10. Model Explaining the Diversity of PI3K Activating Pathways in the Thyroid Cell

Growth factors such as IGF-I activate PI3K through receptor tyrosine kinases; TSH binds to its GPCR and stimulates PI3K activity by two mechanisms: one is dependent on cAMP generation and probably signals to PI3K through cAMP-GEFs and Ras proteins; the second one involves Gβγ subunits that activate PI3K in a cAMP-independent manner and down-regulate NIS gene expression by reducing Pax8 binding to the NIS promoter.

the PI3K isoforms that mediate cAMP, Gβγ, or receptor tyrosine kinase signaling in thyroid cells.

It is well accepted that TSH induces a number of negative feedback loops (through different pathways) that counteract its own proliferative actions as a protective mechanism against tumorigenesis (38, 62). It has been reported the negative regulation elicited by TSH on TSHR expression (51). The significance of the dual regulation of NIS gene transcription by TSH, which at the same time activates through Gαs/cAMP/PKA and represses through Gβγ/PI3K/Akt, is an intriguing issue. The most plausible explanation is that thyroid cells need to maintain a tight control of NIS protein levels, because iodide uptake is the limiting step for thyroid hormone biosynthesis. TSH is the main regulator of this uptake by a mechanism that induces NIS expression both at the transcriptional (6) and posttranscriptional levels (34). The other main regulator of iodide accumulation is the iodide itself that exerts an autoregulatory mechanism that protects the thyroid from high doses of iodide (the so called Wolff-Chaikoff effect) (63). In an analogous way, we interpret the dual opposite actions of TSH (stimulatory through cAMP and inhibitory through Gβγ dimers) as an autoregulatory system to maintain a constant rate of iodide entering the cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

hrTSH was kindly provided by Genzyme (Madrid, Spain). Tissue culture media, bovine TSH, BSA, anti-Flag antibody,

PTX, and bovine insulin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). IGF-I was obtained from Peprrotech (Rocky Hill, NJ). Forskolin, H89, Rp-cAMP, LY294002, wortmannin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), anti-CREB-1, and anti-pCREB antibodies were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Donor calf serum and DMEM were obtained from Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD). cAMP enzyme immunoassay Biotrak (EIA) System (dual range) was from Amersham, General Electric Healthcare (Buckinghamshire, UK). The dual-luciferase reporter assay system and the products for the RT-PCR were purchased from Promega Corp. (Madison, WI). Restriction enzymes were obtained from Invitrogen (Paisley, UK); streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, anti-Akt1/2, anti-CD8α, anti-Sp1, and anti-actin antibodies, and Luminol detection reagent were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-pAkt (pSer472/473/474) was from Pharmingen (San Diego, CA). Anti-Tg antibody was from Dako (Glostrup, Denmark), and anti-Pax8 antibody was from BioPat (Piedimonte Matese, Italy). Vectashield mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA). Anti-NIS antibody was a generous gift from Dr. N. Carrasco (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY). CTX was kindly provided by Dr. M. J. Toro (Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, Spain).

Plasmids

pRL-TK, which contains a cDNA coding for *Renilla*, was used to monitor transfection efficiency. The reporter constructs used were: pNIS-2.8-Luc, which contains a 2.854-bp DNA fragment of the rat *NIS* promoter (33), hTGenh/prm-Luc, which contains the human Tg promoter/enhancer (64), and 3xCRE-Luc, which contains three CREs in tandem (65). N-terminal FLAG-tagged human G-protein β1 subunit and N-terminal HA-tagged human G-protein γ2 subunit, cloned into pcDNA3.1+, were obtained from the Guthrie cDNA Resource Center (Sayre, PA). pCISGαT-1, an expression vector for the α-subunit of bovine transducin, CD8-βARK, an expression vector containing the extracellular and transmembrane domain of the CD8 lymphocyte-specific receptor and the carboxyl-terminal fragment of human βARK1 (35), were kindly provided by Dr. F. Mayor, and Dr. C. Murga (Centro de Biología Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain). The same vector containing the extracellular and the transmembrane domain of the CD8 lymphocyte-specific receptor was used as the control vector in transfection experiments.

Cell Culture

PCC13 cells are a continuous line of thyroid follicular cells derived from Fischer rats that constitute a model system with which to study differentiation and growth regulation in a thyroid epithelial cell setting. These cells express the thyroid-specific genes Tg, TPO, and NIS as well as the thyroid-specific transcription factors TTF1, FoxE1, and Pax8 (66). They were grown in Coon's modified Ham's F-12 medium supplemented with 5% donor calf serum and a six-hormone mixture [1 nM TSH, 10 μg/ml insulin, 10 ng/ml somatostatin, 5 μg/ml transferrin, 10 nM hydrocortisone, and 10 ng/ml glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate] (35, 66). The effect of hormones and growth factors was studied by starving near-confluent cells for TSH and insulin in the presence of 0.2% BSA (starvation medium, indicated as – in the figures) from 2–6 d.

Ligands were added to the culture medium at the following final concentrations: 1 nM TSH, 100 ng/ml IGF-I, and 10 μM forskolin (unless otherwise indicated). hrTSH was used at concentrations ranging from 0.1–1 μg/ml. The inhibitors H89, LY294002, and wortmannin and the cAMP competitor Rp-

cAMP were added to the cells 1 h before hormone addition at the concentrations and times indicated in the experiments described in *Results*. PTX (100 ng/ml) was added 24 h before treatment, and CTX was added for 24 h at a final concentration of 200 ng/ml.

Immunofluorescence Assay

Cells were seeded on coverslips and transfected with the plasmids indicated in Fig. 9. After a 2-d starvation period, cells were stimulated with TSH for 24 h. The PI3K inhibitor LY294002 was added at a final concentration of 10 μ M, 1 h before the hormone treatment. The coverslips were washed three times and fixed in 70% methanol at -20°C for 10 min, washed again, blocked with PBS containing 5% donor calf serum and 0.05% Tween 20 for 1 h at room temperature, incubated with anti-Pax8 and anti-FLAG or anti-CD8 for 1 h at RT, washed three times in PBS-Tween 20 for 5 min, incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibodies Alexa 488 and TexasRed 546, washed three times with PBS-Tween, and mounted on Vectashield containing DAPI (Vector). Cells were observed under a confocal microscope using $\times 63$ magnification under an oil immersion objective (Leica Corp., Deerfield, IL). A 0- to 50- μ m scale is shown in the first picture of the third column. The quantification of the experiments is represented as the percentage of successfully transfected cells that present a clear ($>30\%$) Pax8 cytoplasmic localization. Five different fields were randomly chosen from each experiment. The data are the mean \pm SD of three independent experiments. In all the immunofluorescence studies, the control of cells transfected with $G\beta\gamma$ or β ARK was respectively performed with anti-FLAG or anti-CD8 antibodies.

cAMP Assays

The Biotrak cAMP competitive enzyme immunoassay system was used following the manufacturer's instructions. Briefly, CD8- β ARK- or $G\beta 1/G\gamma 2$ -transfected PCC13 cells were grown in p60 plates (6×10^5 cells), maintained in starvation medium for 2 d, and then treated with 0.5 mM IBMX to inhibit cAMP degradation, followed by 1 nM TSH treatment for 1 h. Cells were then lysed, the lysate was applied to a donkey antirabbit IgG-precoated microtiter plate, and incubated with anti-cAMP antiserum for 2 h at 4°C , after which samples were incubated with a cAMP-peroxidase-conjugated antibody (1 h at 4°C) and washed four times with washing buffer. The enzyme substrate was added immediately afterward to all wells and incubated (1 h at room temperature). Before OD determination in a plate reader at 450 nm, the reaction was terminated by adding 1 M H_2SO_4 to each well. In parallel, a standard curve was prepared with cAMP concentrations ranging from 12.5–3200 fmol/well. Each value represents the mean \pm SD of three different experiments.

Flow Cytometry Assay

PCC13 cells were seeded at a density of 6×10^5 cells per 60-mm-diameter tissue culture dish and maintained in the presence of a six-hormone mixture including TSH, insulin, and 5% serum (control) for 3 d or starved from these factors for 2, 4, or 6 d. After treatment, cells were trypsinized and collected, washed three times in cold PBS, and fixed with ethanol at -20°C overnight. After three washes with cold PBS, cells were stained with propidium iodide (15 μ g/ml). At least 10,000 cells were analyzed per sample, and cell cycle distribution was quantified using a BD Biosciences (San Jose, CA) fluorescence-activated cell analyzer. Data were analyzed with Cell Quest Pro software.

Protein Extraction and Western Blot Analysis

Whole-cell extracts were obtained by resuspending the cell pellet in a buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.0), 2 mM MgCl_2 , 250 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 2M Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml pepstatin A, 10 μ g/ml aprotinin, and 10 μ g/ml leupeptin. When protein extracts were used for luciferase assays, cell pellets were resuspended in passive lysis buffer from the dual-luciferase reporter assay system. Protein concentration was determined according to Bradford (67) with the Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA), protein assay kit. Total cell extract proteins (30 μ g) were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Membranes were blocked in PBS-T buffer (PBS plus 0.1% Tween 20, pH 7.5) containing 5% nonfat milk. After incubation with antibodies in PBS-T containing 5% nonfat milk, membranes were washed four times with PBS-T buffer and incubated with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, followed by four washes of 10 min each with PBS-T buffer. Immunoreactive bands were visualized with the Luminol Western blot detection reagent (Santa Cruz Biotechnology). Protein expression levels were quantified using ImageQuant software (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA). The protein of interest was quantified and normalized in all cases to its loading control.

The graphic below each Western blot assay shows the average of at least three different experiments. Data were analyzed with GraphPad Prism (Intuitive Software for Science, San Diego). Relative protein expression is the mean \pm SD. Statistical significance was determined by *t* test analysis (two-tailed), and differences were considered significant at $P < 0.05$.

EMSAs

Nuclear extracts from PCC13 cells were prepared following the procedure described by Andrews and Faller (68). Protein concentration was measured as described above using BSA as a standard. An oligonucleotide probe corresponding to the Pax8-binding site in the rat *NIS* promoter (site PB within the NUE) (6) was labeled with [γ - ^{32}P]ATP by polynucleotide kinase. Nuclear extracts (7 μ g) from PCC13 cells transfected and treated as indicated in the corresponding figures were incubated with the labeled probe. Binding reactions were performed in a buffer containing 40 mM HEPES (pH 7.9), 200 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 150 ng/ μ l poly(dI-dC), and 5% Ficoll at room temperature for 30 min. Binding reactions were preincubated for 15 min on ice with an excess of cold Pax8 DNA-binding site oligonucleotide or unrelated DNA for competition experiments. When required, an anti-Pax8 antibody directed against the Pax8 DNA-binding site was used. Samples were electrophoresed on a 5% polyacrylamide gel in $0.5\times$ Tris-borate-EDTA. Gels were transferred to Whatman 3MM paper, dried, and autoradiographed.

Transfections

PCC13 cells were plated at a density of 6×10^5 cells per 60-mm-diameter tissue culture dish 48 h before transfection. Transfections were performed by calcium phosphate coprecipitation as described previously (69). Twenty-four hours after transfection, culture medium was changed to starvation medium, and cells were maintained in this medium for 48–72 h or for 5 d for NIS and Tg detection. After this time, cells were treated with the different hormones for the times indicated in each experiment. For NIS, Tg, and CRE promoter activity analyses, cells were transfected with 5 μ g pNIS-2.8, 3 μ g hTGenh/prm-Luc, or 5 μ g 3XCRE-Luc. To correct for transfection efficiency, 0.5 μ g of the Renilla-encoding pRL-TK

vector was added in all cases. Different amounts of FLAG-G β 1, HA-G γ 2, and CD8- β ARK, ranging from 1–5 μ g, were transfected as indicated. After 48 h, cells were harvested, lysed, and analyzed for luciferase and Renilla activities. The promoter activity in cells transfected with the expression vector was determined as the ratio between luciferase and Renilla, relative to the ratio obtained in cells transfected with the corresponding control vector. The results shown are the average \pm SD of three different experiments performed in triplicate, and data were analyzed with GraphPad Prism (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). Statistical significance was determined by *t* test analysis (two-tailed), and differences were considered significant at *P* < 0.05.

Western blots were done where indicated to determine the levels of the transfected expression vectors.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. María José Toro (Alcalá University, Madrid, Spain) for comments and suggestions throughout this work, and for providing cholera toxin. We are indebted to Dr. Nancy Carrasco (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York) for the NIS antibody, to Dr. Federico Mayor, Jr., and Dr. Cristina Murga (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, Spain) for the pCISG α T-1, CD8- β ARK, and CD8 expression vectors, to Dr. Samuel Refetoff (Chicago University, Chicago, IL) for the hTGenh/prm-Luc construct, to Dr. Lucinda Cacicedo (Servicio de Endocrinología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain) for the 3XCRE-Luc construct, to Dr. Antonio De la Vieja (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM, Madrid, Spain) for his help in the statistical analysis, and to Dr. Ronald Hartong for criticisms and linguistic assistance.

Received February 19, 2007. Accepted January 10, 2008.

Address all correspondence and requests for reprints to: Pilar Santisteban, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. E-mail: psantisteban@iib.uam.es.

This work was supported by grants from the Dirección General de Investigación BFU2004-03169, SAF-2007-60614 (MEC) and from FIS of the Instituto de Salud Carlos III (PI042374, PI041216 and RD06/0020/0060). B.G. was a recipient of a postdoctoral contract of the Comunidad de Madrid (Grant CAMGR/SAL/0773/2004), and M.A.Z holds an FPI predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

- Vassart G, Dumont JE 1992 The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* 13:596–611
- Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaokar P, Maresca M, Mariani RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M, Di Lauro R 2002 Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15462–15467
- Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD 2002 Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev* 82:473–502
- Dai G, Levy O, Carrasco N 1996 Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379:458–460
- Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P 2006 A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *Eur J Endocrinol* 155:495–512
- Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R 1999 The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 19:2051–2060
- Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M 2003 The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* 278:3395–3402
- Ortiz L, Zannini M, Di Lauro R, Santisteban P 1997 Transcriptional control of the forkhead thyroid transcription factor TTF-2 by thyrotropin, insulin, and insulin-like growth factor I. *J Biol Chem* 272:23334–23339
- Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P 2007 The Forkhead factor FoxE1 binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. *Mol Cell Biol* 27:7302–7314
- Selzer E, Wilfing A, Schiferer A, Herrmann M, Grubbeck-Loebenstein B, Freissmuth M 1993 Stimulation of human thyroid growth via the inhibitory guanine nucleotide binding (G) protein Gi: constitutive expression of the G-protein α -subunit Gi α -1 in autonomous adenoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1609–1613
- Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G 1996 The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:116–120
- Allgeier A, Laugwitz KL, Van Sande J, Schultz G, Dumont JE 1997 Multiple G-protein coupling of the dog thyrotropin receptor. *Mol Cell Endocrinol* 127:81–90
- Medina DL, Santisteban P 2000 Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* 143:161–178
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL 1998 Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396:474–477
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM 1998 A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282:2275–2279
- de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL 2000 Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem* 275:20829–20836
- Pham N, Cheglakov I, Koch CA, de Hoog CL, Moran MF, Rotin D 2000 The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. *Curr Biol* 10:555–558
- al-Alawi N, Rose DW, Buckmaster C, Ahn N, Rapp U, Meinkoth J, Feramisco JR 1995 Thyrotropin-induced mitogenesis is Ras dependent but appears to bypass the Raf-dependent cytoplasmic kinase cascade. *Mol Cell Biol* 15:1162–1168
- Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE 1994 The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J Biol Chem* 269:13733–13735
- Rhee SG, Bae YS 1997 Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 272:15045–15048
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG 1996 Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:461–480
- Schneider T, Igelmund P, Hescheler J 1997 G protein interaction with K⁺ and Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* 18:8–11

23. Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ 1992 Role of β -subunits of G proteins in targeting the β -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257:1264–1267
24. Vanhaesebroeck B, Leeyers SJ, Panayotou G, Waterfield MD 1997 Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22: 267–272
25. Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS 1994 Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein β γ -subunits. *Nature* 369:418–420
26. Faure M, Vovno-Yasenetskaya TA, Bourne HR 1994 cAMP and β γ -subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* 269:7851–7854
27. van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ 1995 Receptor-tyrosine-kinase- and G β γ -mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376:781–784
28. Cantley LC 2002 The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655–1657
29. Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP 2001 Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22:631–656
30. Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, Backer JM, Birnbaum MJ, Meinkoth JL 1999 Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol Cell Biol* 19:5882–5891
31. Medina DL, Toro MJ, Santisteban P 2000 Somatostatin interferes with thyrotropin-induced G1-S transition mediated by cAMP-dependent protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Involvement of RhoA and cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 complexes. *J Biol Chem* 275:15549–15556
32. Coulonval K, Vandeput F, Stein RC, Kozma SC, Lamy F, Dumont JE 2000 Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B and ribosomal S6 kinases in the stimulation of thyroid epithelial cell proliferation by cAMP and growth factors in the presence of insulin. *Biochem J* 348(Pt 2):351–358
33. Garcia B, Santisteban P 2002 PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. *Mol Endocrinol* 16:342–352
34. Riedel C, Levy O, Carrasco N 2001 Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem* 276:21458–21463
35. Crespo P, Cachero TG, Xu N, Gutkind JS 1995 Dual effect of β -adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. Evidence for a β γ -dependent activation and a G α_{cs} -cAMP-mediated inhibition. *J Biol Chem* 270: 25259–25265
36. Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ 1994 Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G β γ -mediated signaling. *J Biol Chem* 269:6193–6197
37. Hwang JI, Choi S, Fraser ID, Chang MS, Simon MI 2005 Silencing the expression of multiple G β -subunits eliminates signaling mediated by all four families of G proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9493–9498
38. van Staveren WC, Solis DW, Delys L, Venet D, Cappello M, Andry G, Dumont JE, Libert F, Detours V, Maenhaut C 2006 Gene expression in human thyrocytes and autonomous adenomas reveals suppression of negative feedbacks in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 413–418
39. Field JB, Ealey PA, Marshall NJ, Cockcroft S 1987 Thyroid-stimulating hormone stimulates increases in inositol phosphates as well as cyclic AMP in the FRTL-5 rat thyroid cell line. *Biochem J* 247:519–524
40. Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE 1987 Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 52:273–278
41. Bjorklund S, Palmberg S, Rask S, Westerdahl AC, Tornquist K 2005 Effects of sphingosine 1-phosphate on calcium signaling, proliferation and S1P2 receptor expression in PC Cl3 rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 231:65–74
42. Corda D, Kohn LD 1986 Role of pertussis toxin sensitive G proteins in the α 1 adrenergic receptor but not in the thyrotropin receptor mediated activation of membrane phospholipases and iodide fluxes in FRTL-5 thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 141:1000–1006
43. Kato Y, Ozaki N, Yamada T, Miura Y, Oiso Y 2007 H-89 potentiates adipogenesis in 3T3-L1 cells by activating insulin signaling independently of protein kinase A. *Life Sci* 80:476–483
44. Avidor-Reiss T, Nevo I, Levy R, Pfeuffer T, Vogel Z 1996 Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of G β γ . *J Biol Chem* 271: 21309–21315
45. Selbie LA, King NV, Dickenson JM, Hill SJ 1997 Role of G-protein β γ -subunits in the augmentation of P2Y2 (P2U)receptor-stimulated responses by neuropeptide Y Y1 Gi/o-coupled receptors. *Biochem J* 328(Pt 1): 153–158
46. Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR 1992 Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein β γ -subunits. *Nature* 356: 159–161
47. Olanas MC, Onali P 1999 Mediation by G protein β γ -subunits of the opioid stimulation of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb. *Biochem Pharmacol* 57: 649–652
48. Yoshimura M, Ikeda H, Tabakoff B 1996 μ -Opioid receptors inhibit dopamine-stimulated activity of type V adenylyl cyclase but enhance dopamine-stimulated activity of type VII adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 50:43–51
49. Santisteban P, Kohn LD, Di Lauro R 1987 Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells. *J Biol Chem* 262:4048–4052
50. Zarrilli R, Formisano S, Di Jeso B 1990 Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells. *Mol Endocrinol* 4:39–45
51. Shimura H, Okajima F, Ikuyama S, Shimura Y, Kimura S, Saji M, Kohn LD 1994 Thyroid-specific expression and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate autoregulation of the thyrotropin receptor gene involves thyroid transcription factor-1. *Mol Endocrinol* 8:1049–1069
52. Vanhaesebroeck B, Leeyers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD 2001 Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70:535–602
53. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD 2001 Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:615–675
54. Murga C, Fukuhara S, Gutkind JS 2000 A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase β in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J Biol Chem* 275: 12069–12073
55. Lou L, Urbani J, Ribeiro-Neto F, Altschuler DL 2002 cAMP inhibition of Akt is mediated by activated and phosphorylated Rap1b. *J Biol Chem* 277:32799–32806
56. De Gregorio G, Coppa A, Cosentino C, Ucci S, Messina S, Nicolussi A, D'Inzeo S, Di Pardo A, Avvedimento EV, Porcellini A 2007 The p85 regulatory subunit of PI3K mediates TSH-cAMP-PKA growth and survival signals. *Oncogene* 26:2039–2047

57. Van Renterghem P, Vassart G, Christophe D 1996 Pax 8 expression in primary cultured dog thyrocyte is increased by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1307:97–103
58. Poleev A, Okladnova O, Musti AM, Schneider S, Royer-Pokora B, Plachov D 1997 Determination of functional domains of the human transcription factor PAX8 responsible for its nuclear localization and transactivating potential. *Eur J Biochem* 247:860–869
59. Garcia B, Costamagna E, Santisteban P, The transcription factor FoxO1 interacts with Pax8 and inhibits NIS transcription. Program of the 30th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Istanbul, Turkey, 2004, p 23 (Abstract O41)
60. Huang H, Tindall DJ 2007 Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 120:2479–2487
61. Cass LA, Meinkoth JL 1998 Differential effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on p70 ribosomal S6 kinase. *Endocrinology* 139:1991–1998
62. van Staveren WC, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C 2006 Negative feedbacks in normal cell growth and their suppression in tumorigenesis. *Cell Cycle* 5:571–572
63. Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE 1999 Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140:3404–3410
64. Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, Martine U, Schonberger W, Koo E, Weiss RE, Cohen RN, Kimura S, Refetoff S 2002 Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* 109:469–473
65. Fernandez M, Sanchez-Franco F, Palacios N, Sanchez I, Cacicedo L 2005 IGF-I and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate cAMP-response element-binding protein (CREB)-dependent transcription via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in pituitary cells: requirement of Rap1. *J Mol Endocrinol* 34:699–712
66. Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G 1987 One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* 7:3365–3370
67. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
68. Andrews NC, Faller DV 1991 A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19:2499
69. Chen CA, Okayama H 1988 Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6:632–638



Molecular Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.