

Tesis Doctoral que presenta

Rubén Jiménez Canino

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biomédicas

Actividad Tejido-Específica y Regulación Post-Traduccional del Receptor de Mineralocorticoides

Directores de tesis:

Dr. Diego Álvarez de la Rosa

Dra. Teresa Giráldez

Universidad de La Laguna

Facultad de Ciencias de la Salud – Sección de Medicina

Departamento de Ciencias Médicas Básicas – Área de Fisiología

Santa Cruz de Tenerife, 2017

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

1 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Dr. Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez, Profesor Titular de Fisiología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de La Laguna.

Dra. Teresa Giráldez Fernández, Investigadora Ramón y Cajal, Área de Fisiología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de La Laguna.

CERTIFICAN

- Que la Tesis Doctoral titulada “Actividad Tejido-Específica y Regulación Post-Traduccional del Receptor de Mineralocorticoides” presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad de La Laguna, ha sido realizada bajo su dirección por D. Rubén Jiménez Canino.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 6 de Febrero de 2017.

Dr. Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez.

Dra. Teresa Giráldez Fernández

iii

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

3 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

iv

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

4 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

4 / 212

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento especialmente a Diego y Teresa, mis directores de tesis, por acogerme en el grupo y brindarme la oportunidad de formarme en las labores investigadoras, pero también por hacerme crecer en lo personal. Ser partícipe de sus excelentes conocimientos y consejos personales es un privilegio, por su forma de entender la ciencia, su dedicación y por la capacidad que demuestran para abordar cualquier asunto que se les presente, un modelo a seguir a nivel profesional y humano.

Al Dr. Agustín Valenzuela, Dr. David Machado y Dr. Ricardo Borges, por suministrar al grupo material e información que permitieron el avance del trabajo que de otra forma se habría dificultado en exceso, así como facilitar las labores el día a día manteniendo y poniendo a nuestra disposición las excelentes instalaciones de la Unidad de Farmacología, motivando una relación fantástica entre los grupos que trabajan en ellas.

Al Dr. Miguel X. Fernandes por colaborar con nosotros aportando un fantástico trabajo informático de simulación y modelado estructural. También a Mercedes Martín y Rosario González por su excelente contribución en este aspecto tan desconocido para mí.

A los doctores Raimundo Freire, Eduardo Salido, Fátima Gebauer, Rainer Lanz y Celso Gómez por el suministro desinteresado de material importante para el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Tomás González y a los miembros de su grupo por la estrecha y generosa colaboración que mantenemos, especialmente a Pedro, Nacho y Domingo por estar siempre a disposición para echar cuantas manos fueron necesarias.

A la Dra. Nicolette Farman y al Dr. Frederic Jaisser, la primera por ser un auténtico referente en el campo, de conocimiento incommensurable y cuyas aportaciones son siempre de valor incalculable, al segundo por continuar con su legado de forma inmejorable aportando siempre conocimiento y ayuda a nuestro grupo.

v

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

5 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

A la Dra. Dawn Livingstone y al Dr. Matt Bailey, por abrirme las puertas de la maravillosa ciudad de Edimburgo y de su fantástico laboratorio, ambas cosas durante un tiempo que formará parte de un precioso recuerdo toda mi vida.

A todos los profesores e investigadores del Área de Fisiología donde se ha desarrollado la inmensa mayoría del trabajo, especialmente a los doctores Guadalberto Hernández, Fabián Lorenzo, Araceli Morales, Daniel Marcellino y Ángel Acebes, por su ayuda técnica a lo largo de la tesis y por contribuir al buen funcionamiento del laboratorio, por inspirar la capacidad crítica para mejorar como investigador, pero sobre todo por enseñar a hacer las cosas complicadas más sencillas, siempre con una sonrisa, mejor.

En definitiva, a todos los compañeros del departamento con los que he compartido tanto tiempo, los que continúan y los que no, por las largas discusiones científicas y por ser partícipes de los logros y frustraciones en el día a día. Entre todos habéis conseguido el mayor éxito de los grupos que coexisten en el laboratorio, que ha sido sin duda convertir el lugar de trabajo en un hogar. Ha sido genial poder trabajar con amigos. Gracias a todos por inspirarme a mejorar como persona, sin embargo... nunca revelaré la localización de las alícuotas.

A Carol, por estar en todo momento a mi lado, ofreciendo amor y paciencia sin pretender nada a cambio más que motivación e ilusión, en buena parte todo lo que soy te lo debo a ti.

A mi madre por darme el sabio consejo de hacer lo que me gusta, estudiar lo que me gusta y disfrutar con ello, sin ella no hay duda de que nunca habría llegado hasta aquí.

A todos ellos y demás compañeros, familiares y amigos, por hacer posible en definitiva este trabajo con su apoyo incondicional.

“Todo viaje, aunque tenga 1000 leguas, comienza con un solo paso.”

Lao-tse

vi

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

6 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

FINANCIACIÓN

La mayor parte de este trabajo se ha hecho posible gracias a la financiación del programa para “Formación de Profesorado Universitario” de los subprogramas de Formación y de Movilidad dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 en I+D+i.

Se agradece también la financiación concedida por la Universidad de La Laguna a través de las “Becas de investigación de la Fundación CajaCanarias para posgraduados”, convocadas por el Vicerrectorado de Investigación y Transferencia de Conocimiento.

vii

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

7 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

viii

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

8 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

8 / 212

CONTENIDO

Resumen	xiii
Abstract.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Fisiología renal	5
1.1.1 El proceso de reabsorción	6
1.2 Regulación hormonal de la reabsorción de Na ⁺	8
1.3 Fisiopatología renal asociada a la aldosterona.....	12
1.3.1 Utilización clínica de antagonistas de MR.....	14
1.4 El receptor de mineralocorticoides (MR)	15
1.4.1 Estructura del receptor MR.....	17
1.4.2 La proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90)	19
1.5 Mecanismos específicos de tejido de MR.....	20
1.5.1 11-β-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa tipo 2 (HSD2).....	23
1.6 Modificaciones post-traduccionales	26
1.6.1 Regulación post-traducciona de MR.....	28
2. OBJETIVOS	31
3. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y METODOLÓGICO	35
3.1 Cultivo celular y transfección	37
3.2 Variantes fluorescentes de MR y constructos utilizados	38
3.3 Anticuerpos e inmunoensayos	41
3.4 PCR en tiempo real (qPCR).....	42
3.5 Localización subcelular y cinética de traslocación nuclear	43
3.6 Ensayo de ligación <i>in-situ</i> por proximidad (PLA).....	44
3.7 Transactivación con gen reportero.....	44
3.8 Ensayo de unión competitiva de radioligando.....	44
3.9 Análisis de la actividad enzimática de HSD2.....	45

ix

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

9 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

4. ARTÍCULOS PUBLICADOS	47
4.1 Histone Deacetylase 6-Controlled Hsp90 Acetylation Significantly Alters Mineralocorticoid Receptor Subcellular Dynamics But Not its Transcriptional Activity.....	49
4.2 Phosphorylation of Mineralocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Impairs Receptor Activation and Has a Dominant Negative Effect over Non-phosphorylated Receptors.....	49
4.3 The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes.....	49
5. ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN	51
5.1 SUMOylation of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Regulates Cortisol-dependent Mineralocorticoid Receptor Activity (manuscript in press).....	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
6.1 La acetilación de HSP90 como posible modulador de la actividad específica de tejido de MR	57
6.1.1 La acetilación de HSP90 altera la localización subcelular de MR en ausencia de ligando	57
6.1.2 La acetilación de HSP90 modifica la cinética de traslocación nuclear de MR	59
6.1.3 La acetilación de HSP90 tiene un efecto diferencial sobre la actividad transcripcional de MR y GR.....	60
6.1.4 La localización de la acetilación de HSP90 sugiere su importancia en la modulación de MR/GR en células de músculo liso vascular	62
6.2 Regulación de la actividad de MR mediante la SUMOilación de HSD2	64
6.2.1 HSD2 está SUMOilada en la lisina 266.....	64
6.2.2 Influencia de SUMO sobre la actividad enzimática de HSD2.....	65
6.2.3 La SUMOilación de HSD2 regula la traslocación nuclear de MR inducida por cortisol	67

x

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO</i>	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	15/02/2017 15:41:59
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	15/02/2017 21:26:03

10 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

6.2.4 Efecto de la SUMOilación de HSD2 sobre la actividad transcripcional de MR y su unión con coactivadores	69
6.3 Regulación de MR por fosforilación en el dominio de unión al ligando	72
6.3.1 La fosforilación de MR afecta a su cinética de traslocación, pero solo impide parcialmente su acumulación nuclear.....	73
6.3.2 La actividad transcripcional de los dímeros de MR fosforilado es interrumpida debido a un defecto en la unión con coactivadores.....	74
6.3.3 Impacto estructural de la fosforilación sobre el LBD de MR	77
6.4 Mecanismo de acción del diurético Torasemida.....	81
6.4.1 La torasemida es incapaz de promover la traslocación nuclear de MR y no afecta a la traslocación inducida por aldosterona	81
6.4.2 La torasemida no bloquea la actividad transcripcional de MR sobre genes reporteros	82
6.4.3 La torasemida no tiene efecto antagonista sobre la expresión génica endógena inducida por aldosterona.....	83
7. CONCLUSIONES	85
8. CONCLUSIONS.....	89
9. BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXO 1: ARTÍCULOS PUBLICADOS	109
ANEXO 2: MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN	153

xi

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

11 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

ANEXO 3: LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....189

ANEXO 4: LISTA DE ABREVIATURAS.....191

xii

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion</i>	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO</i>	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	15/02/2017 15:41:59
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	15/02/2017 21:26:03

12 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion</i>	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

12 / 212

RESUMEN

La hormona aldosterona aumenta la reabsorción de sodio en epitelios de alta resistencia eléctrica mediante la activación del receptor de mineralocorticoides (MR), un factor de transcripción de la superfamilia de receptores nucleares. MR puede ser además activado por glucocorticoides y presenta una distribución de expresión amplia, habiendo sido implicado en distintos efectos fisiopatológicos en tejidos no epiteliales. La distribución subcelular de MR y su traslocación al núcleo inducida por ligando están controladas, entre otros mecanismos, por su interacción con la proteína de choque térmico HSP90, por la acción degradadora de cortisol de la enzima 11 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD2) y por modificaciones post-traduccionales del propio MR, teniendo efecto todo ello sobre la capacidad transactivadora del receptor sobre sus genes diana. En esta tesis doctoral se estudian los efectos de modificaciones post-traduccionales sobre la biología de MR, concretamente la acetilación de HSP90, SUMOilación de 11 β -HSD2, y fosforilación de MR. Determinamos como estas modificaciones post-traduccionales, relacionadas directa o indirectamente con el receptor, alteran su distribución subcelular y cinética de traslocación al núcleo, modificando la respuesta a mineralocorticoides o glucocorticoides y la regulación de genes implicados en los efectos de la aldosterona. La metodología empleada en estos estudios ha sido además utilizada para evaluar la influencia de la torasemida, un diurético de asa del que se ha propuesto que también actúa como inhibidor de MR, sobre la traslocación nuclear y activación del receptor.

xiii

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

13 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

xiv

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

14 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

14 / 212

ABSTRACT

The hormone aldosterone increases sodium reabsorption in tight epithelia by activating the mineralocorticoid receptor (MR), a member of the nuclear receptor superfamily of transcription factors. In addition to aldosterone, MR can be activated by glucocorticoids. Furthermore, the receptor presents a wide expression distribution, including non-epithelial tissues, where it has been involved in different pathophysiological effects. Subcellular localization of MR and its ligand-induced nuclear translocation are controlled by interaction with heat-shock protein HSP90, cortisol removal by enzyme 11 β -hidroxisteroid dehidrogenase type 2 (11 β -HSD2) and post-translational modifications of MR. This combination of factors regulates MR transcriptional activity on target genes. In this Thesis we study the effects of different post-translational modifications on MR biology, namely HSP90 acetylation, 11 β -HSD2 SUMOylation and MR phosphorylation. We determined how these post-translational modifications alter MR subcellular localization and nuclear translocation kinetics, modifying the response to mineralocorticoids or glucocorticoids and gene regulation. The methodology used in these studies was also applied to evaluate the influence of torasemide, a loop diuretic previously suggested to inhibit MR, over receptor translocation and activation.

xv

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

15 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

15 / 212

xvi

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion</i>	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO</i>	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	15/02/2017 15:41:59
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	15/02/2017 21:26:03

16 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 <i>La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion</i>	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

16 / 212

INTRODUCCIÓN

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

17 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

1. INTRODUCCIÓN

La compartimentalización de los sistemas biológicos y la necesidad de aislar un medio interno de un medio externo hacen de especial necesidad la regulación y el mantenimiento de un equilibrio fisicoquímico entre ambos, estableciéndose valores normales para ciertos parámetros, así como valores máximos y mínimos pasados los cuales se entra en un estado fisiopatológico, que en caso extremo, es incompatible con la vida. El mantenimiento de dicho equilibrio es el fenómeno conocido como homeostasis, que comprende una serie de mecanismos de control y retroalimentación para asegurar una resistencia a las condiciones ambientales y por tanto la viabilidad del organismo. Un importante mecanismo homeostático efector está mediado por las vías endocrinas, a través de la regulación hormonal. Un buen ejemplo de ello es la regulación renal de la presión arterial que ocurre mediante el mantenimiento de la homeostasis iónica y del volumen circulante.

El bombeo del corazón crea la presión necesaria para impulsar la sangre a través de las arterias y sus ramificaciones para seguidamente retornar al corazón por vía venosa. La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre contra la superficie de la pared arterial y se expresa a través de diferentes valores en función de los picos de presión que ejerce el bombeo del corazón sobre el sistema vascular, obteniendo la presión arterial sistólica (valor máximo durante la contracción ventricular), diastólica (valor mínimo durante la relajación ventricular) y el valor medio. Se suele apuntar que la presión arterial es controlada por el gasto cardíaco y la resistencia periférica, sin embargo ese control no se ejerce de forma absoluta ya que depende de multitud de factores fisiológicos que controlan la frecuencia cardíaca, vasoconstricción o vasodilatación y el volumen de plasma sanguíneo. La presión sanguínea debe ser finamente regulada dentro de un rango fisiológico que permita el aporte continuo a todos los órganos, un déficit puede provocar muerte del tejido en cuestión mientras que un exceso incrementa el riesgo de daño en el sistema vascular y órganos. Desviaciones más allá de los valores máximos o mínimos desencadenan un estado patológico conocido como hipertensión o hipotensión respectivamente, tanto la hipertensión como la hipotensión no presentan unos síntomas claros, sin embargo se relacionan con ciertos efectos patológicos que son causa de elevada mortalidad sobre la población, como son

3

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

19 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

las patologías cardíacas asociadas a la elevada presión arterial o el *shock* cardiogénico por una deficiente presión arterial en pacientes sometidos a diálisis. Un importante mecanismo para controlar la presión arterial tiene lugar en el sistema endocrino renal, a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

La señalización hormonal y su regulación comprenden mecanismos fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis y la vida de los organismos biológicos. Un ejemplo de estos mecanismos está mediado por los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, que comprende una gran variedad de proteínas mediadoras de la respuesta específica de ciertas células a ciertas hormonas. En general, estos receptores nucleares tienen la capacidad de ser traslocados al interior del núcleo celular tras la unión con la hormona, en forma homodimérica se unen a ciertas secuencias de DNA llamadas elemento de respuesta hormonal y llevan a cabo un efecto de regulación de la transcripción génica para desembocar en la síntesis de ciertas proteínas, desencadenando así la regulación hormonal de la célula diana, por ello a todos estos receptores se les considera factores de transcripción.

Dentro de la superfamilia de receptores nucleares encontramos los receptores de hormonas esteroideas. Sus ligandos, las hormonas esteroideas, son moléculas liposolubles que una vez liberadas son capaces de atravesar la membrana plasmática para unirse al receptor en el interior celular y producir la respuesta al estímulo, es el llamado efecto genómico. También se describe un efecto más rápido de respuesta tras la unión de la hormona al receptor, que por su velocidad no puede ser explicado mediante este mecanismo, es el efecto no genómico, que comprende una vía mediada por segundos mensajeros tras la unión de la hormona a un receptor de membrana (de forma análoga a lo que ocurre con hormonas hidrosolubles), se trata de un mecanismo menos general que en muchos casos sigue siendo objeto de controversia en el estudio de los mecanismos de acción de los receptores nucleares.

Un ejemplo de mecanismo de acción hormonal sobre su receptor nuclear, objeto de estudio en la presente tesis doctoral, es la acción específica de tejido que muestra la hormona mineralocorticoide aldosterona sobre su receptor, conocido como receptor de mineralocorticoides (MR).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

1.1 Fisiología renal

La estructura macroscópica del riñón comprende una parte externa llamada corteza renal (envuelta por la cápsula renal) y una parte interna llamada médula renal. La arteria renal permite la entrada de un elevado flujo de sangre, sus ramificaciones posibilitan la difusión de la sangre por la corteza para ser filtrada en los glomérulos de las nefronas. Mientras que la sangre filtrada se recoge para su vuelta al sistema circulatorio por la vena renal, el filtrado pasa por los túbulos de las nefronas hacia la porción medular y retorna a la corteza para ser vaciado de forma común en el uréter y desembocar en la vejiga, siendo expulsado en forma de orina al exterior por la uretra (Fig. 1). Es de extrema importancia la modificación que sufre el filtrado a lo largo de los túbulos de las nefronas, contribuyendo a las funciones principales del órgano. En referencia al plasma sanguíneo, los riñones son capaces de regular: la concentración de los productos de desecho, electrolitos e iones, el pH y el volumen. La regulación del volumen de plasma sanguíneo constituye una importante vía de regulación de la presión arterial.

La nefrona es la unidad estructural funcional del riñón, consta de: el glomérulo (también conocido como corpúsculo de Malpighi) envuelto por la cápsula de Bowman, el tubo contorneado proximal, la rama descendente y ascendente del asa de Henle y el túbulo contorneado distal. La cápsula glomerular aísla el glomérulo renal, una red de capilares donde se produce el filtrado y depuración del plasma sanguíneo, el espacio entre el glomérulo y la cápsula es el espacio de Bowman, que está en continuidad con la luz del túbulo para verter a su interior el filtrado glomerular. El túbulo contorneado proximal recibe el filtrado glomerular, sus microvellosidades aumentan la superficie de contacto para favorecer el proceso de reabsorción de ciertas moléculas al plasma sanguíneo. El filtrado pasa por el asa de Henle desembocando en el túbulo contorneado distal, más corto que el proximal y con menos microvellosidades, sin embargo, también ocurre el proceso de reabsorción. Los túbulos contorneados distales de numerosas nefronas confluyen en túbulos colectores donde el filtrado sigue sufriendo reabsorción en menor medida, finalmente desemboca en el uréter, ya considerado orina, para ser vaciado en la vejiga y su posterior expulsión al exterior (Fig. 1).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

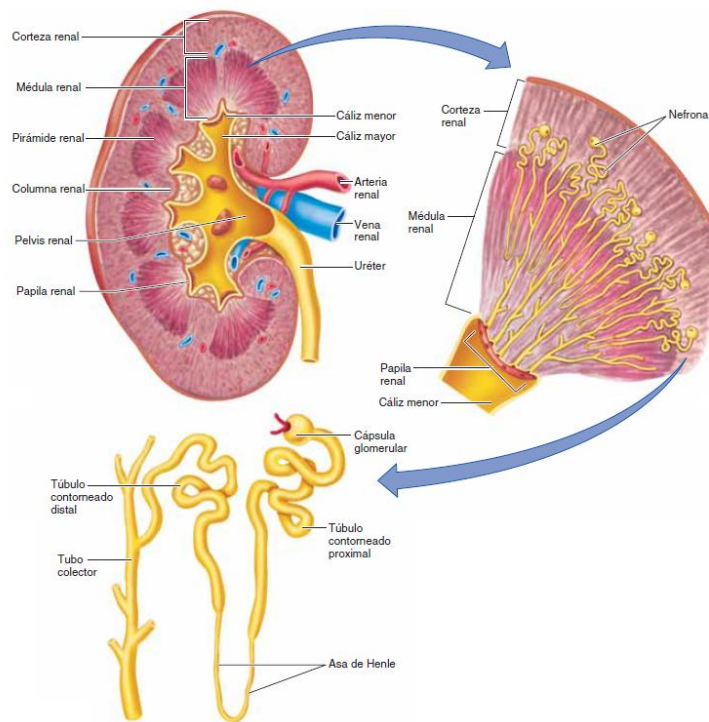


Figura 1: Anatomía y estructura del riñón. En detalle se muestra la disposición y estructura de las nefronas. Stuart Ira Fox (Fisiología Humana, 13ª edición 2014, McGraw-Hill).

1.1.1 El proceso de reabsorción

La reabsorción de moléculas a partir del filtrado glomerular ocurre mediante el proceso de ósmosis a través de las paredes de los túbulos de las nefronas. A través del túbulo contorneado proximal y la rama descendente se reabsorbe la mayor parte del agua del filtrado glomerular, manteniendo así el volumen y la presión sanguínea. La reabsorción de agua por ósmosis a través de las paredes de los túbulos requiere de un gradiente de concentración iónica, principalmente de sodio (Na^+), entre el filtrado y el líquido intersticial en contacto con el plasma de los capilares adyacentes, para provocar el movimiento transversal del agua. El Na^+ es el principal contribuyente a la osmolaridad del fluido extracelular, más del 99% de Na^+ que se filtra en los riñones es reabsorbido.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

El transporte de Na^+ al líquido intersticial genera una diferencia de potencial a través de la pared del túbulo que se compensa con el transporte de cloro (Cl^-) en la misma dirección (hacia la mayor concentración de Na^+), elevándose la concentración de cloruro sódico (NaCl) en el líquido intersticial y creando el gradiente osmótico necesario para la difusión del agua de forma pasiva al plasma. Ambos iones (Na^+ y Cl^-) se mueven a través del epitelio de forma transcelular a través del interior celular y de forma paracelular a través del intersticio entre las uniones celulares, sin embargo el predominio de una forma de transporte u otra depende fundamentalmente del tramo de la nefrona en el que ocurre.

La reabsorción de sodio es el proceso fundamental para el mantenimiento de la presión arterial, su mecanismo está basado en la presencia de la Na^+, K^+ -ATPasa en la membrana basal de las células epiteliales de la pared del túbulo, la salida de Na^+ de la célula hacia el líquido intersticial provoca un descenso de la concentración intracelular de Na^+ , y con ello que se genere un gradiente que permite la entrada del Na^+ desde el filtrado en la luz del túbulo a través de la membrana apical por mediación de cotransportadores, así se genera un movimiento iónico constante que promueve el transporte de agua y da lugar al mantenimiento de la presión arterial. La salida de Na^+ por la membrana basolateral a través de la Na^+, K^+ -ATPasa está acoplada a la entrada de potasio (K^+) en la célula, la existencia de canales de K^+ en la membrana basal permiten el reciclaje del K^+ para ser devuelto al líquido intersticial. Existe también un transporte pasivo de Na^+ a través de las uniones entre las células epiteliales, que en el túbulo contorneado proximal permite el retorno de una parte del Na^+ reabsorbido al lumen que se encuentra en menor concentración. A lo largo de la rama descendente y ascendente del asa de Henle ocurre de igual forma una reabsorción de Na^+ y agua a través de las células epiteliales, existe un transporte neto en menor cuantía en comparación con el túbulo contorneado proximal. Sin embargo, la mayor parte de la reabsorción total de Na^+ en las ramas del asa de Henle ocurre por el transporte pasivo a través de las uniones entre las células. Al igual que en el túbulo contorneado proximal, se trata de una reabsorción y un mantenimiento de la presión sanguínea basal, no presenta regulación hormonal, hasta un 85% del agua y Na^+ filtrados se reabsorbe de forma continua en estos primeros tramos de los túbulos de las nefronas.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

La reabsorción de Na^+ a través de la rama ascendente del asa de Henle también promueve la salida de Cl^- y el gradiente de NaCl para la reabsorción de agua, sin embargo las paredes de la porción final están engrosadas y tienen una menor permeabilidad al agua. En este tramo la cantidad de Na^+ reabsorbida a través de las células y entre ellas ocurre aproximadamente en igual medida. A partir de aquí aparecen canales de K^+ en la membrana apical que permiten la excreción a la luz del túbulo. La menor permeabilidad al agua del epitelio provoca que el filtrado se vaya diluyendo conforme avanza mientras que el líquido intersticial se va concentrando, de esta manera ocurren dos fenómenos: 1) el líquido intersticial próximo al asa ascendente se encuentra a su vez en contacto con el asa descendente, multiplicando así el gradiente que provoca la reabsorción de agua en el tramo descendente, y 2) al llegar el filtrado al túbulo contorneado distal, éste será hipotónico respecto al líquido intersticial.

El segundo fenómeno descrito hace que en los tramos finales de la nefrona se requiera un transporte activo regulado para permitir el proceso de reabsorción, que ocurrirá casi exclusivamente a través del interior de las células epiteliales. A partir de aproximadamente el 15% restante del filtrado que llega al túbulo contorneado distal, es donde se produce un ajuste fino del proceso de reabsorción en el túbulo contorneado distal y túbulo colector, donde deja de existir la difusión pasiva, la reabsorción ocurre exclusivamente a través de las células, mediado por la regulación hormonal y da lugar a una regulación fina de la presión arterial. Esto ocurre mediante la regulación del volumen circulante, principalmente a partir del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la hormona antidiurética (ADH) o vasopresina y el péptido natriurético auricular (ANP).

1.2 Regulación hormonal de la reabsorción de Na^+

La aldosterona es el principal y más potente mineralocorticoide en mamíferos. Pese a su naturaleza esteroidea, es relativamente soluble en agua y por ello circula predominantemente libre en sangre. La aldosterona aumenta la reabsorción de Na^+ y secreción de K^+ y protones (H^+) en la parte más alejada del túbulo contorneado distal y en la porción cortical del túbulo colector de las nefronas, también en el colon distal y glándulas sudoríparas y salivares. La función más conocida y estudiada de la aldosterona se sitúa en las células epiteliales de los túbulos de las nefronas en el riñón. Mantiene el equilibrio homeostático de estos electrolitos, el equilibrio ácido-base, el mantenimiento del volumen de plasma sanguíneo y la regulación de la presión arterial.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

La aldosterona (Fig. 2) es una hormona esteroidea de la familia de los mineralocorticoides (Simpson et al., 1954), se sintetiza a partir de la corticosterona mediante oxidación del carbono 18 por la aldosterona sintasa, principalmente en la capa glomerulosa de la corteza suprarrenal. Todas las hormonas esteroideas derivan del colesterol (Fig. 2), mediante el corte de la cadena lateral unida al anillo "D" (anillo de 5 carbonos) por mediación de enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450 y posterior adición o eliminación de grupos funcionales a distintos carbonos. Este proceso es conocido como esteroidogénesis, a partir del cual el colesterol deriva en el progestágeno pregnenolona, el precursor común de la síntesis del resto de hormonas esteroideas (otros progestágenos, mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos, a partir de los cuales se sintetizarán los estrógenos). El aparato enzimático para la producción de las hormonas esteroideas a partir del colesterol se encuentra casi exclusivamente restringido a la corteza suprarrenal y las gónadas sexuales, aunque hay casos en los que existe una cierta síntesis local de esteroides en ciertos tejidos.

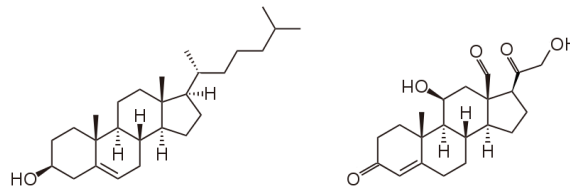


Figura 2: Estructura química del colesterol ($C_{27}H_{46}O$) a la izquierda, $P_m = 385,65$ g/mol; y de la aldosterona ($C_{21}H_{38}O_5$) a la derecha, $P_m = 360,44$ g/mol.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (Fig. 3) es uno de los principales mecanismos de control de la presión arterial (Atlas, 2007). Las células yuxttaglomerulares del riñón detectan mediante barorreceptores una disminución del volumen sanguíneo y la presión arterial, liberando como respuesta renina (producida a partir de la prorenina) directamente a la sangre. La renina es una proteasa que cataliza la eliminación de un enlace peptídico cercano al extremo COOH-terminal del precursor angiotensinógeno, liberado por el hígado, transformándolo en un péptido de 10 aminoácidos llamado angiotensina I. En el endotelio de los pulmones y también en menor medida en células endoteliales del riñón, la enzima convertidora de angiotensina (ACE) elimina los 2 últimos aminoácidos del extremo COOH-terminal de la

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

angiotensina I, convirtiéndola en el péptido de 8 aminoácidos fisiológicamente activo, la angiotensina II. La angiotensina II estimula la contracción de las capas de músculo liso de pequeñas arterias y arteriolas, produciendo así una potente vasoconstricción arteriolar que contribuye al incremento directo de la resistencia periférica elevando la presión arterial. A su vez promueve el incremento de la presión arterial mediante dos mecanismos adicionales: 1) en el hipotálamo estimula la sed, promoviendo la ingesta de líquido para aumentar el volumen sanguíneo, y estimula la liberación de ADH por la hipófisis, y 2) en la corteza suprarrenal aumenta potentemente la síntesis y liberación de aldosterona, que provoca retención de NaCl y excreción de un menor volumen de orina.

La aldosterona contribuye a un aumento de la presión arterial, actuando principalmente a nivel renal (túbulo contorneado distal y túbulo colector), donde aumenta la reabsorción de Na⁺ y de esta forma promueve la retención de agua para aumentar el volumen circulante y la presión arterial. El aumento en la reabsorción de Na⁺ se basa en el aumento de la expresión del canal epitelial de sodio (ENaC) en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo. ENaC proporciona una ruta de alta afinidad para la entrada de sodio a la célula a través de la membrana apical. Esta entrada de sodio está acoplada a su salida por la superficie basolateral gracias a la actividad de la Na⁺,K⁺-ATPasa. Como consecuencia, se produce un transporte vectorial de sodio a través del epitelio, estableciéndose una diferencia de potencial transepitelial, quedando el lumen del túbulo con carga negativa, lo que promueve a su vez la excreción de K⁺ y H⁺ (Alvarez de la Rosa et al., 2013). Dado el acoplamiento entre la reabsorción de Na⁺ y la secreción de K⁺, el sistema renina-angiotensina-aldosterona da lugar a un mecanismo de eliminación del K⁺ extracelular con la orina. La reabsorción de Na⁺ promueve la reabsorción de agua, aumentando el volumen circulante implicado en el aumento de la presión arterial.

La secreción de aldosterona aumenta también como respuesta a una concentración baja de Na⁺ de modo indirecto, debido a la reducción del volumen plasmático que detectan los barorreceptores renales, como se comentó anteriormente. Así mismo, la síntesis y consecuente secreción de aldosterona también es estimulada de forma directa por una elevación de la concentración plasmática de K⁺, de forma independiente al sistema renina-angiotensina-aldosterona, mediante la despolarización de las células secretoras de aldosterona.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdV0CS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

La hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH) se libera desde la parte anterior de la hipófisis y tiene un efecto estimulante sobre la corteza suprarrenal, dando lugar a la secreción de cortisol y aldosterona. Su regulación forma parte del eje hipotalámico-hipofisario, es estimulada mediante la hormona liberadora de corticotropina (CRH) liberada desde neuronas hipotalámicas e inhibida por retroalimentación negativa mediante los corticosteroides secretados.

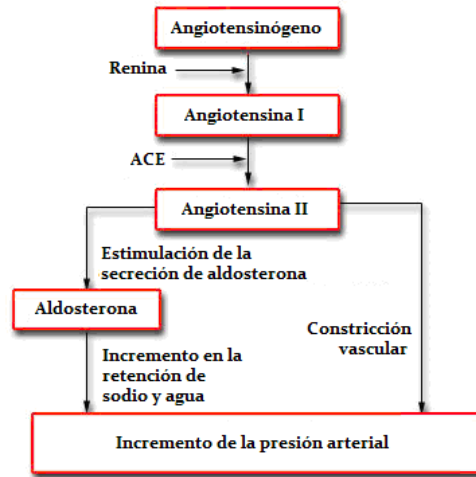


Figura 3: Sistema renina-angiotensina-aldosterona.

La pared del túbulo colector es impermeable a la alta concentración de NaCl que lo rodea, sin embargo es permeable al agua, el agua es reabsorbida y pasa rápidamente al plasma. La ADH se libera desde la hipófisis como respuesta a un aumento de la osmolaridad de la sangre por disminución del volumen de plasma, deshidratación o ingesta excesiva de sal, es un mecanismo mediado por neuronas hipotalámicas (osmorreceptores) para responder ante la disminución del volumen sanguíneo y la presión arterial y contrarrestar el efecto. La estimulación de los osmorreceptores producen la sensación de sed para la ingesta de agua y la liberación de ADH, la ADH se une a receptores de membrana de las células de la pared del túbulo colector para estimular la producción de AMPc a partir de ATP. El AMPc actúa como un segundo mensajero aumentando la expresión de acuaporinas en la superficie de las células,

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

estimulando así la reabsorción de agua y la excreción de un menor volumen de orina. Con la ADH se estimula también la reabsorción de urea en el tramo más distal del túbulo colector, un compuesto con alto contenido en nitrógeno producto del metabolismo que también contribuye a la hipertonicidad de la médula renal para estimular la reabsorción de agua. La reducción de la osmolaridad sanguínea provoca una menor liberación de ADH, dando lugar a una menor reabsorción de agua, la caída del volumen plasmático resultan en un incremento de la secreción de renina y por tanto estimulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona. La aldosterona a diferencia de la ADH, no actúa diluyendo la sangre, ya que la reabsorción de agua se produce junto con la reabsorción de una cantidad proporcional de sal. La contribución de la ADH al mantenimiento del volumen extracelular es menor que la mediada por la aldosterona, considerándose esta última el principal sistema de regulación del volumen extracelular mientras que la ADH se considera principal regulador de la osmolaridad plasmática.

En respuesta a un elevado volumen plasmático, junto con la inhibición en la secreción de aldosterona y ADH, el estiramiento de las paredes auriculares en el corazón estimula la secreción de ANP en los cardiomiocitos auriculares. El ANP se une a un receptor guanilil ciclasa que aumenta la producción de GMPc a partir de GTP, promoviendo el aumento del flujo de sangre al riñón y la tasa de filtración glomerular. Incrementa la carga de Na⁺ reduciendo la reabsorción pasiva de Na⁺, incrementa la excreción de Na⁺ y agua de la sangre filtrada en los glomérulos, actuando como diurético para promover la mayor excreción de sal y agua en la orina, un mecanismo opuesto a la acción de la aldosterona.

1.3 Fisiopatología renal asociada a la aldosterona

La hipertensión o elevada presión sanguínea constituye un problema relevante de salud pública, afectando al 25% de la población adulta en sociedades industrializadas (Burt et al., 1995). La hipertensión es un factor de riesgo para causas comunes de morbilidad y mortalidad. A pesar de ello los mecanismos patogénicos fueron durante mucho tiempo desconocidos debido a la gran cantidad de factores ambientales y fisiológicos relacionados (Stanton et al., 1982), pero el desarrollo de técnicas moleculares y la clonación de MR (Arriza et al., 1987) han permitido identificar genes, vías y dianas candidatos a la intervención terapéutica (Lifton, 1996), permitiendo desentrañar

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

mecanismos moleculares que conducen a las alteraciones patológicas de la presión arterial.

La asociación existente entre las alteraciones en la secreción o acción de la aldosterona y el desarrollo de hipertensión e hipotensión (Lifton et al., 2001) demuestra que la regulación del transporte transepitelial de Na⁺ a través de ENaC es crítico para la homeostasis del fluido extracelular y el control de la presión sanguínea. Existen diversos defectos en la secreción o acción de la aldosterona que se asocian con hipertensión e hipotensión:

- Hiperaldosteronismo: secreción de aldosterona anormalmente alta, se produce la alta actividad de ENaC, se incrementa la reabsorción de Na⁺ y disminuye el K⁺ en plasma. Da lugar a hipertensión, retención de agua e hipopotasemia. Existen dos tipos: el primario o Síndrome de Conn, causado por un adenoma suprarrenal productor de aldosterona (Young, 2002; Funder, 2011) y el secundario, causado por hiperactividad del sistema renina-angiotensina (Santos et al., 2012).
- Pseudohiperaldosteronismo: patología similar al hiperaldosteronismo debida a la hiperactividad de los órganos efectores de la aldosterona, normalmente va acompañada de bajos niveles de aldosterona en plasma. Conocido como Síndrome de Liddle, presenta actividad constitutiva de ENaC debido a una mutación que impide la ubiquitinación del canal por Nedd4-2, y por tanto se evita su degradación proteasomal (Ronzaud et al., 2013).
- Hipoaldosteronismo: baja secreción de aldosterona, disminuye la actividad de ENaC y la reabsorción de Na⁺, aumenta el K⁺ en plasma. Da lugar a hipotensión, deshidratación, pérdida de sal e hiperpotasemia. P.e. deficiencia en la aldosterona sintasa (White, 2004).
- Pseudohipoaldosteronismo: se relaciona con el hipoaldosteronismo por la resistencia de los órganos efectores a la aldosterona, aunque se presentan niveles de aldosterona elevados en plasma. Existen al menos dos tipos: el tipo I, causado por mutaciones inactivantes de ENaC (Kucher et al., 2011) o MR (Geller et al., 1998); y el tipo II o Síndrome de Gordon, causado por mutaciones en las quinasas WNK, que regulan la actividad de ENaC, canales de K⁺ y cotransportador de Na⁺ y Cl⁻ en el riñón (Hoorn et al., 2012).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- Otro ejemplo es el Síndrome de Exceso Aparente de Mineralocorticoides (AME), enfermedad autosómica recesiva donde la disfunción de HSD2 produce la activación inapropiada de MR por glucocorticoides, especialmente el cortisol. Causa hipertensión, hipopotasemia y alcalosis metabólica, pese a la presencia de niveles bajos de aldosterona en plasma (White et al., 1997).

1.3.1 Utilización clínica de antagonistas de MR

La utilización de antagonistas esteroideos de MR, como espironolactona o eplerenona es útil para regular la presión arterial en caso de hiperaldosteronismo, además de presentar estos antagonistas un efecto beneficioso ante patologías cardíacas asociadas a la hipertensión, reduciendo la fibrosis cardíaca asociada al daño cardíaco (Kolkhof et al., 2012). Además, los antagonistas de MR se utilizan conjuntamente con diuréticos de asa como la furosemida o torasemida para potenciar la bajada de la presión arterial y evitar la pérdida de K^+ asociado a los mismos. El mecanismo de acción de los diuréticos de asa ocurre en la rama ascendente del asa de Henle, interfiriendo el cotransportador Na^+ , K^+ y Cl^- , de forma que se impide la reabsorción de Na^+ y por tanto se excreta una mayor cantidad de líquido en la orina.

La búsqueda de antagonistas no esteroideos de los receptores de esteroides ha tenido gran importancia clínica con el objetivo de evitar efectos secundarios producidos por los efectos de los antagonistas esteroideos, particularmente en MR para evitar el desequilibrio del balance iónico, especialmente el aumento en la concentración de K^+ en sangre (hiperpotasemia), en el tratamiento de la presión arterial. El uso de los diuréticos de asa como la torasemida ha resultado beneficioso en el tratamiento de patologías cardiovasculares, consiguiendo además un efecto diurético más prolongado por su mayor vida media y mayor biodisponibilidad en comparación con la furosemida. Además la torasemida presenta efectos beneficiosos sobre el riesgo de daño cardiovascular disminuyendo las tasas de mortalidad y morbilidad. Esto ha llevado a la hipótesis de que la torasemida podría tener un efecto adicional al diurético, sugiriendo un posible efecto antagonista de MR para bloquear la unión de la aldosterona (Uchida et al. 1992). La torasemida se ha relacionado con la reducción de la fibrosis cardíaca por incidir específicamente en el sistema vascular, lo cual podría estar relacionado con la interferencia de factores profibrosis como la angiotensina II, pero también con la aldosterona. La falta de información al respecto hace interesante la investigación de los

14

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

30 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

mecanismos moleculares de acción de la torasemida por el potencial terapéutico en el tratamiento del daño cardíaco (Buggey et al., 2015), identificando las vías de acción para explorar la posibilidad de su administración en conjunto con antagonistas de MR obteniendo así un tratamiento con efectos beneficiosos aditivos mediante la incidencia en distintas vías.

Más recientemente ha surgido la finerenona como un antagonista de MR no esteroideo, con base dihidropiridínica. Es un compuesto altamente selectivo que cumple la función de antagonista de MR evitando la retención de K^+ causante de la hiperpotasemia desarrollada con el uso de los antagonistas esteroideos (Bramlage et al., 2016). Los estudios clínicos han comenzado con resultados prometedores sobre pacientes con daño cardiovascular y renal, aportando los buscados efectos positivos en el corazón mientras que se evitan los efectos negativos en el riñón.

1.4 El receptor de mineralocorticoides (MR)

En 1963 Peter Karlson cristalizó la ecdisona, una molécula relacionada con la pupación y muda en insectos, la describió como un esteroide y desarrolló la idea de la acción de las hormonas esteroideas basada en la regulación génica. Hacia los años 70 ya se había descrito la presencia de receptores intracelulares que mediarían la respuesta de las hormonas esteroideas, hasta que en 1974, 20 años después de haberse descubierto la aldosterona, Isidore Edelman describió su receptor, el receptor de mineralocorticoides (MR). El gran salto en la comprensión de los mecanismos moleculares y fisiológicos mediados por MR comenzó en 1987 cuando Arriza et al., publicaron el clonaje de MR en el laboratorio de Ron Evans. Mediante homología con GR aislaron el gen codificante para una proteína de 107 kDa, demostrando la capacidad de unir, además de cortisol, aldosterona con alta afinidad activando la transcripción específica de genes en respuesta a aldosterona.

La naturaleza lipídica de la aldosterona le permite atravesar libremente la membrana para unirse a MR, también conocido como receptor de aldosterona, miembro de la superfamilia de receptores nucleares. La familia de receptores de esteroides (superfamilia de receptores nucleares, subfamilia 3), a la cual pertenece MR, es un conjunto de proteínas con un papel importante como mediadores de la acción de hormonas esteroideas en multitud de procesos fisiológicos, relacionados por ejemplo

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

con la homeostasis de metabolitos, desarrollo de órganos y respuesta a estímulos externos (Griekspoor et al., 2007).

La formación del complejo receptor-ligando en MR y otros receptores nucleares produce la traslocación al núcleo y la unión a secuencias específicas de DNA conocidas como elemento de respuesta hormonal (HRE) en forma dimérica (Binart et al., 1995). Uno o varios HRE se encuentran corriente arriba de la caja TATA, en la región 5' del gen diana, la unión en forma dimérica del complejo MR-aldosterona al HRE ejerce su actividad transcripcional mediante el reclutamiento de correguladores transcripcionales que se unen al complejo, su papel mejor caracterizado es modular la expresión de genes relacionados con el transporte transepitelial de Na^+ , incluyendo las tres subunidades que forman ENaC para su expresión en la membrana apical y las dos subunidades que forman la Na^+, K^+ -ATPasa para su expresión en la membrana basal (Fig. 4). Como se comentó anteriormente, ENaC y la Na^+, K^+ -ATPasa son responsables de la reabsorción de Na^+ hacia el líquido intersticial y la subsiguiente reabsorción de agua responsable del aumento de la presión arterial, a cambio de la excreción transepitelial de K^+ y H^+ a través de canales en la membrana apical. Además MR modula la expresión de otros genes implicados en la regulación del sistema, como SGK1, una serina/treonina-kinasa que aumenta la expresión del canal ENaC mediante la fosforilación de la ubiquitina-ligasa Nedd4-2, de forma que la inactiva impidiéndole ubiquitinar ENaC y previniendo la degradación del canal (Alvarez de la Rosa et al., 1999). A diferencia de otros canales iónicos cuya regulación se basa en rápidos cambios en su cinética de apertura y cierre, ENaC se controla en gran medida por el aumento o descenso de su expresión en superficie (Alvarez de la Rosa et al., 2000). La aldosterona es el principal mecanismo de regulación de ENaC en tejidos epiteliales, existe una expresión diferencial de los genes diana de MR que permiten la activación específica en cada tejido diana de la aldosterona (Hernandez-Diaz et al., 2013). MR se expresa también en tejidos no epiteliales, participando en diversos procesos como la homeostasis cardiovascular, diferenciación de adipocitos, neurogénesis o regulación de la actividad neuronal.

Se ha sugerido la posibilidad de que la aldosterona ejerza efectos no genómicos ya que se describen efectos muy rápidos de la hormona (del orden de unos pocos minutos) que no se pueden explicar mediante la regulación transcripcional y síntesis *de novo* de proteínas. Se explica mediante la activación de un receptor de membrana, que

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

provocaría una cascada de eventos secundarios a través de la movilización de segundos mensajeros, tal y como ha sido descrito para otras hormonas esteroideas, sin embargo no hay demostración formal de ello (Fuller et al., 2005).

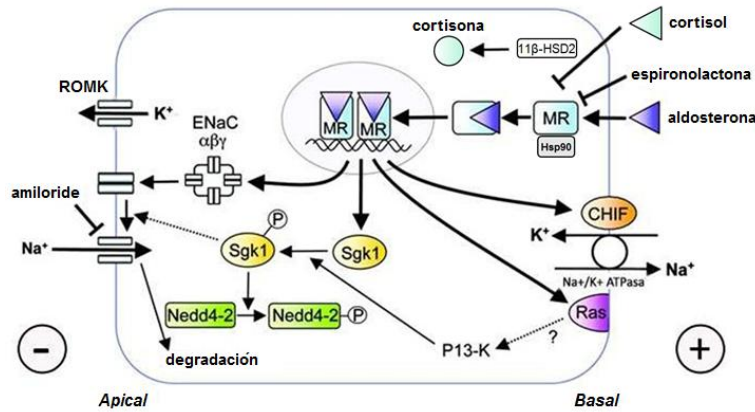


Figura 4: Respuesta de una célula epitelial renal a la aldosterona. Modificado de Fuller y Young, 2005.

1.4.1 Estructura del receptor MR

La aparición evolutiva de MR se asocia a una duplicación de un receptor ancestral de glucocorticoides, que dio lugar a MR y al receptor de glucocorticoides actual (GR), posibilitando la aparición del sistema de regulación por hormonas mineralocorticoides, la principal de las cuales es la aldosterona (Pippal et al., 2008).

El gen NR3C2 codifica para el MR humano (hMR), se encuentra situado en el cromosoma 4, es un fragmento génico de aproximadamente 450 Kb, formado por 10 exones, 2 de los cuales no se traducen (Viengchareun et al., 2007). El mRNA se traduce en una proteína de 984 aminoácidos, en la que, al igual que los demás miembros de la familia de receptores nucleares, se distinguen 3 dominios (Fig. 5):

- NTD: dominio NH₂-terminal. Región implicada en regulación de la actividad transcripcional, es altamente variable. MR presenta la de mayor longitud entre los receptores de esteroides, presentando una baja homología con GR.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- DBD: dominio de unión a DNA. Región altamente conservada entre los receptores de esteroides, presenta dos dedos de zinc que reconocen secuencias específicas de DNA también altamente conservadas (HRE). Existe una significativa reacción cruzada con los genes diana de GR. Esta región está relacionada también con la dimerización del receptor.

- LBD: dominio de unión al ligando. Región hidrofóbica con el bolsillo de unión al ligando. Es una región que presenta una variabilidad media entre los receptores de esteroides. Presenta alta homología con el LBD de GR, presentando alta afinidad por aldosterona y también por glucocorticoides.

Además, MR presenta las llamadas regiones AF (*Activation Function domains*), distribuidas por el NTD y el LBD, son regiones necesarias para el reclutamiento de correguladores. Especialmente la unión de coactivadores a las regiones AF de MR, son un mecanismo clave que confiere especificidad de tejido a la acción del receptor, contribuyendo a la regulación fina de la actividad transcripcional del receptor dando lugar a patrones diferenciales de expresión génica bajo distintos contextos celulares.

La distribución subcelular citosólica de MR en ausencia de ligando y nuclear tras su activación dependiente de ligando es controlada estructuralmente por la presencia de tres secuencias de localización nuclear (NLS) localizadas en el dominio NTD (NLS0), en el DBD entre los dos dedos de zinc (NLS1) y en el LBD (NLS2), que actúan de forma cooperativa para inducir la traslocación del receptor (Walther et al., 2005). Además se ha hallado una secuencia de exportación nuclear (NES) bien conservada, localizada en el DBD próxima a NLS0 (Black et al., 2001).

Existen distintas modificaciones post-traduccionales a lo largo de la estructura proteica que son capaces de controlar la exposición de las NLS y NES para regular de forma efectiva la localización subcelular y traslocación del receptor tras su activación, así como la mayoría de aspectos críticos para la función del receptor (estabilidad, dimerización, unión a ligando y actividad transcripcional), que pueden ser modificados regulando de forma drástica la función del receptor según el contexto tejido-específico en el que se encuentra (Faresse et al., 2014).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

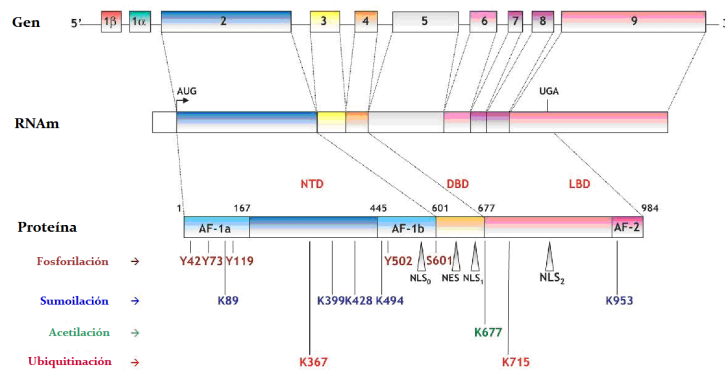


Figura 5: Estructura del gen, mRNA y proteína MR, en la zona baja se representan residuos susceptibles de modificaciones post-traduccionales y regiones relacionadas con la importación y exportación nuclear. Viengchareun et al., 2007.

1.4.2 La proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90)

Los receptores de esteroides se distribuyen según un equilibrio entre su importación y exportación entre núcleo y citosol (Kumar et al., 2006). En células epiteliales MR presenta una localización predominantemente citoplasmática en ausencia de ligando (Rafestin-Oblin et al., 1989), unido a otras proteínas, tales como la proteína de choque térmico HSP90, otras proteínas chaperonas e inmunofilinas (Gallo et al., 2007).

La interacción de MR con la chaperona HSP90 en el citosol (Fig. 4) es importante por mantener la conformación apropiada de los receptores de esteroides para la unión del ligando (Smith et al., 2008). La unión de la aldosterona a los receptores de esteroides provoca la liberación de HSP90 y se promueve la traslocación nuclear y la actividad transcripcional del receptor. Trabajos muy recientes con MR relacionan la actividad de HSP90 con la actividad transcripcional del receptor (Seiferth et al., 2012) y demuestran la importancia de HSP90 en la traslocación del receptor al núcleo tras la unión de la hormona (Galigniana et al., 2010). La traslocación de MR al núcleo se supone posible mediante la exposición de secuencias de localización nuclear (NLS), expuestas una vez se une el ligando al receptor (Walther et al., 2005).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Se ha descrito que la acetilación/desacetilación del residuo K294 de HSP90 es importante para la modulación de la actividad de esta proteína. La acetilación de K294 inhibe la actividad de HSP90. Una histona desacetilasa de tipo II, HDAC6, implicada en importantes mecanismos celulares mediante su actividad desacetilasa (Valenzuela-Fernandez et al., 2008; Cabrero et al., 2006), es la responsable de la desacetilación y por tanto la activación de HSP90 (Scroggins et al., 2007). Se ha demostrado como HSP90 nativa y HSP90 desacetilada interaccionan con el receptor de andrógenos (AR) permitiendo la conformación requerida para la unión de la hormona y por tanto la traslocación del receptor al núcleo, mientras que HSP90 acetilada no interacciona con el receptor no permitiendo la unión de la hormona y por tanto impidiendo la traslocación al núcleo (Ai et al., 2009). También se ha descrito la acetilación de HSP90 como un mecanismo que provoca una deficiente unión del ligando, traslocación nuclear y transactivación de GR (Murphy et al., 2005), sugiriéndose el estado reversible de acetilación de HSP90 como único mecanismo responsable de la actividad del complejo de chaperonas liderado por HSP90 (Kovacs et al., 2005). En ausencia de ligando, MR presenta una distribución heterogénea, localizándose entre el citosol y el núcleo, generalmente en células epiteliales la distribución es principalmente citoplasmática, sin embargo existen diferencias de tipo celular. Los niveles de expresión de HSP90 se han relacionado con cambios de la localización del receptor en cardiomiocitos (Hernandez-Diaz et al., 2010).

El desconocimiento del efecto funcional de la acetilación de HSP90 sobre MR hace de interés el estudio de la actividad transactivadora del receptor en función de dicha modificación. Es de especial interés la acetilación de HSP90 en su residuo 294, así como abordar los posibles cambios en la dinámica celular del receptor, correlación con cambios de localización subcelular y comparación con el efecto funcional sobre otros receptores de esteroides evolutivamente cercanos a MR.

1.5 Mecanismos específicos de tejido de MR

A pesar de la alta homología que presentan MR y GR, en lo que respecta a la unión de ligando y elementos de respuesta hormonal, las funciones fisiológicas de ambos receptores son específicas y no intercambiables. Los mecanismos que otorgan especificidad al receptor ocurren a distintos niveles (Pascual-Le Tallec y Lombes, 2005). La expresión diferencial de MR junto con la actividad catalítica de la enzima

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdvrOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

HSD2 constituyen el primer nivel de selectividad (pre-receptor). La especificidad para el reconocimiento de la hormona, su dinámica de unión, interacciones intramoleculares diferenciales y unión a DNA constituyen un segundo nivel de selectividad (receptor). El reclutamiento de correguladores de la actividad transcripcional permite un tercer nivel de selectividad (post-receptor).

La demostración de la expresión de MR en tejidos no epiteliales sugiere que este receptor y su ligando fisiológico, la aldosterona, podrían tener otras funciones además de la asociada a su actividad mineralocorticoide. Se ha propuesto que el receptor ejerce funciones variadas, habiendo sido implicado en multitud de patologías, incluyendo afecciones cardíacas, neurológicas, cáncer, inflamación y numerosos desórdenes metabólicos.

Es particularmente importante la presencia de MR en el sistema cardiovascular, estudios epidemiológicos revelan que el riesgo de enfermedades cardiovasculares se incrementa junto con el aumento de la presión sanguínea, mientras que el tratamiento farmacológico de la hipertensión reduce la morbilidad y mortalidad con un gran descenso del riesgo de padecer secuelas cardiovasculares como el infarto de miocardio (Mosterd et al., 1999; Kannel, 2000). Existen distintos fármacos utilizados para combatir la hipertensión arterial, como diuréticos, vasodilatadores, bloqueantes adrenérgicos, inhibidores de la ACE o antagonistas del receptor de la angiotensina II. Sin embargo, se ha demostrado un efecto altamente beneficioso del uso combinado con antagonistas de MR a dosis bajas que no alteran significativamente la presión arterial en situaciones de insuficiencia cardíaca (Pitt et al., 1999 y 2003). En los últimos años ha aumentado el interés en la farmacología de MR, particularmente para prevenir el daño cardiovascular derivado de los niveles altos de aldosterona, que actúa como factor profibrótico (Kolkhof et al., 2012). También se ha demostrado la presencia e importancia de MR en el sistema nervioso central (Nishi et al., 2004), donde se describe una subunidad del canal ENaC, regulada por una isoforma de SGK1 específica de cerebro, en relación con patologías asociadas al mismo (Giraldez et al., 2012). En la última década ha sido demostrada la expresión de MR en tejido adiposo, relacionado fundamentalmente con la diferenciación celular de adipocitos, involucrado en desórdenes metabólicos como diabetes, obesidad o síndrome metabólico (Armani et al., 2015).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Las bases moleculares que modulan la especificidad de tejido de MR para dar lugar a la regulación específica de ciertos conjuntos de genes es todavía un campo muy escasamente conocido. Actualmente se sabe que la acción de aldosterona-MR se basa en la regulación de genes específicos que difieren entre distintos tejidos. Se hipotetiza que esta especificidad se logra, al menos en parte, mediante interacción con correguladores transcripcionales. Se han descrito muchos correguladores de la función transcripcional de MR, hasta la fecha se ha publicado la presencia de 11 coactivadores (Tabla 1) y 5 correpresores (Tabla 2), que juegan un importante papel en la función de MR (Yang et al., 2009) y por tanto potencialmente involucrados en distintas patologías relacionadas con el receptor.

Coactivador	Región	Función
SRC-1	AF-2, AF-1	Reclutamiento del complejo de acetilación de histonas
SRC-2 (TIF2)	AF-1, AF-2	Promueve la transactivación
p300/CBP	AF-1, AF-2	Ejerce actividad histona acetil transferasa
PGC-1 α	AF-2	Recluta el complejo histona acetil transferasa
RHA	AF-1a	Componente del complejo RNA polimerasa II
ELL	AF-1b	Factor de elongación de la RNA polimerasa II
FLASH	AF-1	Regula la apoptosis celular
FAF-1	AF-1	Regula la apoptosis celular
Ubc9	NTD	Enzima SUMO E2 de conjugación
TIF1- α	NTD	Coactivador transcripcional
RIP140	NTD	Coactivador de receptores nucleares

Tabla 1: Coactivadores de la actividad transcripcional de MR. Extraído de Yang et al., 2009.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Correpresor	Región	Función
SMRT	LBD	Histona desacetilasa
NCoR	LBD	Histona desacetilasa
DAXX	NTD	Regula la apoptosis celular
PIAS1	NTD ± LBD	Enzima SUMO-E3 ligasa
NF-YC	Desconocido	Desconocida

Tabla 2: Correpresores de la actividad transcripcional de MR. Extraído de Yang et al., 2009.

El estudio de la biología celular de MR y las bases moleculares que regulan la especificidad de su función en los distintos tejidos es de interés para la obtención de herramientas eficaces en el tratamiento de las diversas patologías relacionadas con MR.

1.5.1 11-β-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa tipo 2 (HSD2)

Es importante resaltar que la aldosterona no es el único ligando fisiológico de MR. De hecho, los glucocorticoides como por ejemplo el cortisol, también se unen a MR con alta afinidad (Arriza et al, 1987; Chapman et al., 2013). Debido a que este glucocorticoide es la hormona esteroidea mayoritaria y se encuentra en el plasma 100-1000 veces más concentrado que la aldosterona, MR debería estar siempre ocupado por cortisol y se perdería el efecto específico de la aldosterona. En aquellos tejidos diana de la aldosterona (riñón, colon y otros epitelios de alta resistencia eléctrica) el principal mecanismo de protección de MR frente a la activación por cortisol se debe a la actividad de la enzima 11β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2 (11β-HSD2, en adelante HSD2).

HSD2 se expresa junto a MR en tejidos diana de aldosterona, principalmente en el riñón, donde cataliza la reacción irreversible de transformación de 11β-hidroxi-glucocorticoides en 11-ceto-esteroides en presencia de NAD. Los principales sustratos de HSD2 son el cortisol (glucocorticoide mayoritario en la mayoría de los mamíferos) y corticosterona (predominante en roedores) transformándolos en cortisona (Fig. 6) o 11-dehidrocorticosterona respectivamente, moléculas sin capacidad de unión a MR (Funder

23

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

39 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

et al., 1988). La importancia de este sistema para proteger a MR de una inactivación inapropiada por glucocorticoides se demuestra por el descubrimiento de diferentes mutaciones puntuales de HSD2 en pacientes que desarrollan el llamado Síndrome de Exceso Aparente de Mineralocorticoides (AME). La confirmación de la patogénesis del síndrome vino con el clonaje de HSD2, gen expresado en las mismas células de la nefrona que expresan MR y ENaC. Estas mutaciones disminuyen en mayor o menor medida la acción enzimática de HSD2 (Mune et al., 1995), dando lugar a una sobreactividad de MR en condiciones fisiológicas (Ferrari, 2010), con la consiguiente hipertensión. Estos hallazgos consiguieron explicar la patogénesis de la hipertensión en pacientes con el síndrome expuesto, además de explicar el fenotipo similar detectado en otros pacientes y que se origina por la ingesta prolongada de regaliz natural, que contiene ácido glicerrético y su derivado carbenoxolona (Stewart et al., 1987), que son potentes inhibidores de HSD2. En otros casos se puede dar un efecto similar por sobreproducción de cortisol hasta niveles que superan la capacidad de HSD2 de convertirlo a cortisona (Hurley et al., 1991).

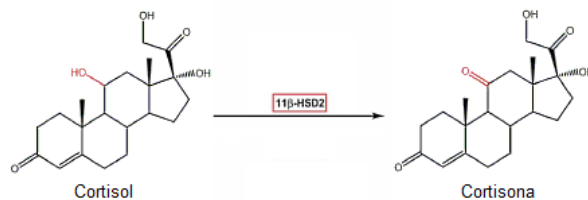


Figura 6: Reacción irreversible de conversión de cortisol en cortisona catalizada por 11β-HSD2 mediante deshidrogenación del carbono 11.

El estudio detallado de la cinética de HSD2 muestra que la capacidad de esta enzima de eliminar completamente el cortisol de las células diana de aldosterona es limitada. Un posible mecanismo para superar esta limitación sería la creación de un microambiente de baja concentración de cortisol alrededor de MR. De hecho, se ha propuesto una interacción entre HSD2 y MR en el retículo endoplasmático, dando lugar a la regulación de la activación del receptor inducida por aldosterona y a cambios en su distribución subcelular, pasando de una distribución predominantemente citoplasmática a una mayoritariamente reticular (Odermatt et al., 2001). Sin embargo, esta propuesta se basa

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

en datos de localización por microscopía confocal que no demuestran concluyentemente la colocalización de ambas proteínas.

Hasta ahora se desconoce la existencia de mecanismos de regulación de la actividad de HSD2. La sugerencia de una interacción entre MR y HSD2 ha llevado a examinar la posible función reguladora de proteínas que interaccionan físicamente con HSD2 *in vitro*. Una de las proteínas identificadas mediante ensayo de doble híbrido es PIAS1 (N. Farman y cols., comunicación personal), un factor de la familia de Proteínas Inhibidoras de STAT Activado (PIAS), capaces de actuar como SUMO-ligasas (Rytinki et al., 2009). Se ha demostrado que la adición del polipéptido SUMO es capaz de estabilizar a la proteína SUMOilada y en ocasiones de modificar su actividad enzimática. A pesar de tener una localización eminentemente nuclear, PIAS1 es capaz de SUMOilar proteínas citosólicas (Takahashi et al., 2008). Además, PIAS1 ya ha sido descrito como un factor que interacciona y SUMOila MR en ciertos tipos celulares (Tallec et al., 2003; Tirard et al., 2004). Debido a ello hipotizamos que PIAS1 u otra proteína de la familia PIAS podría SUMOilar a HSD2 *in vivo*, regular su actividad o incluso hacer de puente para una interacción molecular entre HSD2 y MR.

La identidad del ligando que activa MR en tejidos no epiteliales, que en general demuestran baja o nula expresión de HSD2, ha sido ampliamente debatido, implicando la posibilidad de que el receptor sea activado por glucocorticoides. Recientemente se ha demostrado que en miocardio la aldosterona es capaz de regular de forma específica la actividad de MR como factor de transcripción (Messaoudi et al., 2013), si bien los mecanismos de selectividad implicados son desconocidos. Se ha propuesto que los glucocorticoides como el cortisol actúan como agonistas de la aldosterona en tejidos epiteliales pero como antagonistas en tejidos no epiteliales (Funder, 2000), si bien el mecanismo implicado en este efecto es desconocido. Por otro lado, se han propuesto múltiples mecanismos de especificidad de tejido para MR, además de la actividad de HSD2, en relación con la respuesta al equilibrio entre mineralocorticoides y glucocorticoides y en relación con la expresión conjunta de MR y GR (Farman et al., 2001).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

1.6 Modificaciones post-traduccionales

El estudio de la biología celular de MR y las bases moleculares de su regulación y de la regulación de proteínas asociadas como HSP90 y HSD2 es fundamental para entender la especificidad de su función en los distintos tejidos, además de ser de interés para la obtención de herramientas eficaces en el tratamiento de diversas patologías. Un importante mecanismo molecular para la regulación de la actividad proteica son las modificaciones post-traduccionales.

Las modificaciones post-traduccionales son procesos enzimáticos que permiten la modificación de ciertos aminoácidos de una proteína, añadiendo grupos funcionales químicos, péptidos, grupos hidrofóbicos, cambios estructurales o cambios de aminoácidos (Fig. 7). Estas modificaciones permiten la regulación de la función proteica, ya sea la actividad, localización o interacciones, mediante el cambio conformacional a través de la modificación del conjunto de interacciones que ocurren entre los distintos residuos de la proteína. Entre las modificaciones post-traduccionales descritas más importantes para la regulación de la actividad de proteínas, en especial de receptores nucleares, y que han sido descritas particularmente para MR, encontramos la ubiquitinación, fosforilación, acetilación o SUMOilación, un conjunto de modificaciones capaces de modificar por ejemplo la estabilidad del receptor, su activación, dimerización, unión a DNA, unión al ligando o interacción con correguladores (Faresse et al., 2014).

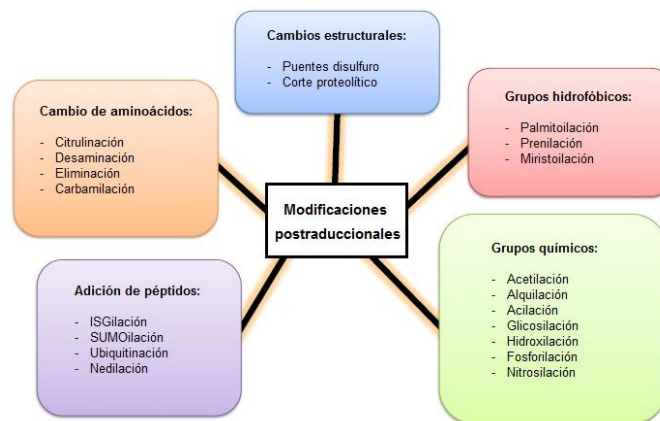


Figura 7: Tipos de modificaciones post-traduccionales proteicas.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

La ubiquitinación es la adición covalente de un pequeño polipéptido de 8,5 kDa muy bien conservado en eucariotas, relacionado con la vía citosólica de degradación de proteínas, pero también con efectos reguladores. Se puede añadir un solo monómero de ubiquitina (monoubiquitinación) o multitud de monómeros de forma encadenada (poliubiquitinación). Ocurre sobre lisinas de la proteína diana, mediado por enzimas E1 de activación, E2 de conjugación, y en última instancia las enzimas E3 de ligación, llamadas ubiquitin-ligasas.

La fosforilación es la adición de un grupo fosfato (PO_4^{3-}) sobre serinas, treoninas o tirosinas, generalmente altera el estado funcional de la proteína diana. Está mediada por proteínas con actividad quinasa (fosfotransferasas), utilizando principalmente como reservorio de grupos fosfato el ATP. En muchos casos la fosforilación es utilizada como mecanismo de activación de proteínas en “cascada”, dando lugar a una amplificación de la señal intracelular.

La acetilación es la adición de un grupo acetilo (CH_3CO). Presenta efectos reguladores similares a la fosforilación, efectos estructurales en relación a la regulación de la transcripción génica por la acetilación de histonas y efectos reguladores del estado energético de la célula, ya que depende de la disponibilidad de acetil CoA y del balance NAD/NADH. Ocurre sobre lisinas que forman parte de distintos motivos consenso generalmente bien conservados y está mediado por la actividad de enzimas acetil transferasas (acetilasas).

La SUMOilación de lisinas es la adición del polipéptido de 11 kDa llamado SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), ocurre generalmente sobre la secuencia consenso Ψ -K-x-D/E, donde Ψ es un residuo hidrofóbico, K es la lisina conjugada covalentemente a la molécula de SUMO, x es cualquier aminoácido, y D o E es un residuo de ácido aspártico o glutámico. La SUMOilación se ha relacionado con la actividad de factores de transcripción, reparación de DNA y ciclo celular. Está mediado por enzimas E1 de activación, E2 de conjugación y E3 de ligación (con actividad SUMO ligasa), análogas a las encargadas de la ubiquitinación. Recientemente se ha descrito la regulación mediante SUMOilación a través de distintos motivos de interacción con SUMO (SIM), mediante interacciones de naturaleza no covalente (Zhao et al., 2014).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdVOCs
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

1.6.1 Regulación post-traducciona de MR

En su estado no asociado a ligando MR es capaz de interactuar con diversas proteínas en el citosol que se relacionan con modificaciones de la capacidad transactivadora del receptor y por tanto son de indudable relevancia fisiológica. Algunas de estas proteínas presentan la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales en el receptor, un campo de estudio poco desarrollado actualmente, si bien ya se han descrito un buen número de residuos susceptibles de ser acetilados, SUMOizados, fosforilados o ubiquitinados (Viengchareun et al., 2007).

La acetilación de otros receptores de esteroides ya ha sido descrita y ha dado lugar a proponer la existencia en MR de ciertos motivos susceptibles de ser acetilados que se relacionan con la actividad transcripcional del receptor (Popov et al., 2007). La acetilación de receptores de esteroides y de MR se relaciona con el complejo coactivador CBP/p300, aunque sólo se ha descrito la existencia de un motivo de alta probabilidad de acetilación en la lisina 677. En un trabajo reciente se describe como la inhibición de una desacetilasa (HDAC3) provoca sobreacetilación de MR de forma que se inhibe su actividad transcripcional, impidiendo además en cierta medida el desarrollo de hipertensión (Lee et al., 2013). Sin embargo, no se conoce la totalidad de los residuos concretos que son acetilados, ni las consecuencias funcionales de dicha modificación y tampoco la función que podría tener la modificación del estado de acetilación mediado por aldosterona.

La SUMOización ha resultado ser en general un tipo de modificación muy importante en la regulación de factores de transcripción y específicamente de forma muy notable sobre la superfamilia de receptores nucleares, que presentan secuencias consenso de SUMOización muy conservadas evolutivamente y que se relacionan con una represión de la capacidad transactivadora. En MR se han encontrado cuatro sitios de SUMOización dentro del NTD, en las lisinas 89, 399, 428 y 494 y uno en el LBD, en la lisina 954 (Tirard et al., 2007). Además se han descrito como SUMO ligasas capaces de interactuar con el NTD de MR a PIAS1 (Pascual-Le Tallec et al., 2003) y Ubc9, que por el contrario se relaciona con un aumento de la actividad transcripcional (Yokota et al., 2007).

28

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

44 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

La poliubiquitinación de proteínas ha sido clásicamente relacionada con la señal para la degradación de proteínas en el proteasoma. Esto mismo ha sido descrito para MR como un mecanismo esencial de regulación de la actividad transcripcional mediante el mantenimiento de un *pool* de receptores disponibles para su activación (Tirard et al., 2007). Se han descrito las lisinas 367 y 715 como susceptibles de ser poliubiquitinadas en MR, sin embargo no se correlacionan con la degradación del receptor, por lo que se sugiere la existencia de más residuos poliubiquitinables (Yokota et al., 2004). Más recientemente la monoubiquitinación se ha descrito como mecanismo de regulación más complejo, mediando la regulación transcripcional independiente del proteasoma. Sin embargo, pese que se sugiere que MR pueda ser monoubiquitinado, no se ha demostrado dicha modificación, residuos susceptibles o enzimas responsables en MR.

A diferencia de otros receptores de esteroides la fosforilación de MR ha sido poco estudiada. Sin embargo, actualmente ya se ha descrito la fosforilación de distintos residuos en relación con la regulación de la actividad transcripcional (Alnemri et al., 1991). Se ha demostrado la fosforilación de distintos residuos en el NTD, por ejemplo, la tirosina 73 que incrementa la actividad del receptor en respuesta a aldosterona (Marissal-Arvy et al., 2004); la serina 601 presente en una secuencia de localización nuclear (NLS) en el DBD, relacionado con impedimento de la traslocación nuclear (Walther et al., 2005); y otros residuos como la treonina 735 y la serina 737 presentes en el LBD, relacionadas con el cambio conformacional del receptor (Hirschberg et al., 2004).

Muy recientemente se ha descrito la fosforilación del residuo S843 del LBD como una modificación inactivante de MR en células intercaladas del túbulo colector renal en respuesta a una disminución de los niveles de angiotensina II y un aumento del K^+ circulante (Shibata et al., 2013). Es interesante notar que la fosforilación en S843 es modulada en direcciones opuestas por 2 estímulos fisiológicos que incrementan la secreción de aldosterona: disminución del volumen plasmático e hiperpotasemia. Shibata et al., sugiere un mecanismo de regulación de la reabsorción de agua y secreción de K^+ cuando se debe maximizar una respecto a la otra. Este trabajo explica la incapacidad de MR fosforilado en S843 para ejercer la transactivación por una disminución de la afinidad de MR por aldosterona, consistente con la presencia de dicho

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

residuo en el entorno del bolsillo de unión al ligando, explicando la inactivación del receptor exclusivamente por el defecto en la unión del ligando al receptor.

En la presente tesis doctoral estudiamos como distintas modificaciones post-traduccionales, tales como la acetilación, SUMOilación y fosforilación, tanto del propio MR como de proteínas que interaccionan con el receptor, regulan la actividad y con ello su correcta distribución y/o traslocación al núcleo, regulando así su función de modular la expresión de ciertos genes que intervienen en procesos fisiológicos concretos como por ejemplo la regulación de la homeostasis del sodio o la actividad tejido-específica de MR.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

OBJETIVOS

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

47 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

47 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

2. OBJETIVOS

Basándonos en la hipótesis de que la especificidad de ligando y la actividad tejido-específica de MR vienen determinadas, al menos en parte, por la modificación post-traduccional del receptor o de proteínas asociadas, hemos propuesto los tres primeros objetivos concretos:

1. Determinar el impacto de la acetilación de HSP90 en el residuo K294 sobre la dinámica celular y actividad de MR.
2. Analizar la actividad enzimática de HSD2 dependiente de la SUMOilación en el residuo K266 y su efecto sobre MR.
3. Definir las causas de la modulación de la actividad transcripcional de MR por su fosforilación en el residuo S843.

Las técnicas desarrolladas para el abordaje de estos tres objetivos nos permitieron plantear un cuarto objetivo concreto:

4. Explorar si el mecanismo de acción del diurético torasemida incluye el bloqueo de MR para unir aldosterona.

33

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO</i>	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	15/02/2017 15:41:59
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	15/02/2017 21:26:03

49 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> <i>En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

PLANTEAMIENTO
EXPERIMENTAL Y
METODOLÓGICO

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

51 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

3. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y METODOLÓGICO

La compartimentación subcelular y los movimientos dinámicos de los receptores de esteroides están relacionados con su función de regulación de la transcripción (Nishi, 2011). Por ello, nos proponemos analizar los siguientes aspectos concretos para abordar cada uno de los objetivos generales estudiados:

- 1- La distribución subcelular en ausencia de hormona.
- 2- La distribución subcelular y cinética de traslocación al núcleo en presencia de hormona.
- 3- La capacidad transactivadora de promotores y genes diana.
- 4- La unión del ligando al receptor.
- 5- La interacción del receptor con coactivadores de la transcripción.
- 6- Proponer mecanismos de acción atendiendo a la relevancia tejido-específica de cada fenómeno.

3.1 Cultivo celular y transfección

Las líneas celulares utilizadas para este trabajo fueron:

- Células COS-7: de túbulo colector renal de mono verde africano (Gluzman, 1981), obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Se cultivan en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). El medio DMEM es suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos (penicilina a 10000 U/ml, estreptomycin a 10 mg/ml y Mycozap al 0,2%, Lonza).
- Células HL-1: cardiomiocitos auriculares de ratón (Claycomb et al., 1998), cedidos por el Dr. Antonio Castrillo (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid). Se cultivan en medio Claycomb (Sigma). El medio Claycomb es suplementado con FBS al 10%, antibióticos (penicilina a 10000 U/ml y estreptomycin a 10 mg/ml), noradrenalina 0,1 mM en ácido ascórbico y L-

37

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

53 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Planteamiento experimental y metodológico

glutamina 2 mM. Las células son cultivadas sobre la superficie tratada previamente con una solución de gelatina 0.02% y fibronectina 25 µg/ml.

- Células A-10: procedentes de músculo liso de aorta torácica de rata (Tsugita et al., 2008), cedidas por el Dr. Celso Gómez-Sánchez (Division of Endocrinology, University of Mississippi Medical Center, Jackson, MS). Se cultivan en medio DMEM, suplementado de igual forma que para el caso de las COS-7.

- Células H9C2-MR: cardiomiocitos derivados de ventrículo embrionario de rata que expresan MR de forma estable (Fejes-Toth et al., 2007), cedidas por la Dra. A. Fejes-Toth (Darmouth Medical School, Lebanon, NH). Se cultivan en medio DMEM/F12, suplementado de igual forma que para el caso de las COS-7.

Las células fueron cultivadas en un incubador (Thermo Scientific) a 37°C y una atmósfera con 100% de humedad y 5% de CO₂ en el medio apropiado, se observaron con un microscopio invertido (Olympus CKX41) y se realizó el conteo de células viables en una cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripán.

La transfección se llevó a cabo sustituyendo el medio de cultivo por otro con FBS tratado previamente con carbón activado (*charcoal stripped serum, FBS-CS*) para eliminar los esteroides presentes. Las células fueron transfectadas utilizando el reactivo Polyplus Transfection (jetPRIME) siguiendo las indicaciones del fabricante. La disminución de los niveles de proteína endógena y/o transfectada se llevó a cabo mediante el uso de secuencias de siRNA disponibles comercialmente (Sigma-Aldrich).

3.2 Variantes fluorescentes de MR y constructos utilizados

La utilización de variantes fluorescentes de MR ha resultado complicada por el hecho de que las fusiones con el extremo COOH-terminal generan un receptor inactivo, mientras que las realizadas con el extremo NH₂-terminal producen receptores con actividad disminuida (Fejes-Toth et al., 1998). Nuestro laboratorio ha utilizado una técnica de transposición *in vitro* seguido de un procedimiento de selección y evaluación de actividad de los receptores mutantes para la incorporación de YFP en secuencias internas de MR, encontrando la construcción MR-147-YFP indistinguible de MR nativo en relación a la traslocación nuclear, afinidad aparente inducida por ligando para la transactivación de genes diana, unión al DNA y regulación de vías no genómicas (Aguilar-Sanchez et al., 2012). Sobre esta construcción de MR hemos obtenido,

38

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

54 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Planteamiento experimental y metodológico

mediante técnicas de clonaje y mutagénesis dirigida, las distintas construcciones de MR utilizadas en esta tesis doctoral, que presentan la inserción de diferentes proteínas fluorescentes o epítomos en la posición 147 de MR, manteniendo los mismos parámetros del receptor nativo para los aspectos críticos de la dinámica subcelular y actividad transcripcional del receptor (Aguilar-Sanchez et al., 2012).

Las construcciones plasmídicas utilizadas en este trabajo se resumen en la tabla 3:

Proteína expresada	Vector	Proveedor	Referencia
MR-147-YFP	pcDNA4/TO	RT-PCR de riñón de ratón C57BL/6 y subclonaje	Aguilar-Sanchez et al., 2012
MR	pcDNA3	Farman, N.	Fagart et al., 1998
GR	pcDNA3	Farman, N.	Hellal-Levy et al., 1999
GR-GFP	pEGFP-C1	Farman, N.	Muller et al., 2004
HSP90	pCMV-SPORT6	Geneservice Ltd. y subclonaje	NP_034610.1
HDAC6-GFP	pEGFP-N1	Valenzuela, A.	Valenzuela-Fernandez et al., 2005
HDAC6-DN-GFP	pEGFP-N1	Valenzuela, A.	Valenzuela-Fernandez et al., 2005
FLAG-HSD2-HA	pcDNA3	Odermatt, A.	Odermatt et al., 2001
Sumo1-YFP	pEYFP	Addgene	13380
FLAG-SENP1	pFlag-CMV	Addgene	17357
SRC1-HA	pcDNA3.1	RT-PCR de hipocampo de ratón y subclonaje	Jimenez-Canino et al., 2016b
GRE2x-Luc	-	Lenz, R.	Hernandez-Diaz et al., 2010
MMTV-Luc	pFC31Luc	Lenz, R.	Gouilleux et al., 1991
pSG5-Ren	pSG5	Gebauer, F.	Hernandez-Diaz et al., 2010
NGal-Luc	pGL4.10-Luc	Jaisser, F.	Latouche et al., 2012

Tabla 3: Constructos plasmídicos utilizados en las transfecciones.

39

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

55 / 12

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Planteamiento experimental y metodológico

Las modificaciones para retirar un inserto y/o introducir otro se realizaron mediante el uso de enzimas de restricción (New England BioLabs), el kit de purificación Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), el kit para el ligado del inserto Fast-Link DNA Ligation Kit (Epicentre) y posterior transformación de bacterias competentes Top10 de *E. coli* (Invitrogen). En la tabla 4 se muestran los clonajes realizados:

Construeto generado	Vector	Construeto x dianas de restricción / Cebadores 5'-3'
MR-147-GFP	pcDNA4/TO	pcDNA4/TO-MR-147-YFP x AscI Se extrajo YFP e introdujo la secuencia codificante de GFP
MR-147-HA	pcDNA4/TO	MR-147-YFP x AscI Se extrajo YFP e introdujo la secuencia codificante de HA
HSP90-CFP	pECFP-N1	pcMV-SPORT6-HSP90 x F-AACTGCAGGCCACCATGCCTGAGGAAACCCAGACC R-GGGGTACCGTGTCTACTTCTTCATGCGTGAT
HDAC6-HA	pcDNA3.1	pEGFP-N1-HDAC6-GFP x F- ACTTAAGCTTGCCACCATGTATCCATACGATGTT CCAGATTACGCTACCTCAACCGGCCAGGATTCC R- CGAGTCTAGATTAGTGTGGGTGGGCGATATCCTC
HDAC6-DN-HA	pcDNA3.1	pEGFP-N1-HDAC6-DN-GFP x F- ACTTAAGCTTGCCACCATGTATCCATACGATGTT CCAGATTACGCTACCTCAACCGGCCAGGATTCC R- CGAGTCTAGATTAGTGTGGGTGGGCGATATCCTC
HSD2-CFP	pECFP-N1	pcDNA3-FLAG-HSD2-HA x F-CGGAATTCGCCACCATGGAGCGCTGGCCTTGCCGTC R-ACGCGGTACCTGCCGAGCCTGTCTGGGGAAGG
HA-SENPI	pcDNA3.1	pcDNA3.1-FLAG-SENPI x F-ACTTAAGCTTGCCACCATGTATCCATACGATGTT CAGATTACGCTGATGATATTGCTGATAGGATGAGG R-CGGGATCCTCTAGAGTCGAC

Tabla 4: Clonajes realizados, sitios de restricción y cebadores empleados en su caso. En rojo se señalan los sitios de restricción utilizados para el clonaje: AAGCTT = HindIII, TCTAGA = XbaI, CTGCAG = PstI, GGTACC = KpnI, GAATTC = EcoRI; subrayado se señala la secuencia Kozak para el inicio de la traducción; en azul se señala el tag incorporado: TATCCATACGATGTTCCAGATTACGCT = HA.

La introducción de mutaciones (Tabla 5) se llevó a cabo con el sistema de mutagénesis dirigida Quickchange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent), utilizando cebadores con las mutaciones a incorporar diseñados con el software Primer3 (Howard Hughes Medical Institute and National Institutes of Health) y posterior transformación de bacterias competentes XL10-Gold de *E. coli* (Agilent).

40

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

56 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Mutante generado	Descripción	Cebadores en dirección 5'-3'
HSP90-K295Q	Simula acetilación	F-GAAGAACTCAACAAAACA c AGCCGATTGGACGAG R-CTCGTCCAAATCGG C TgTGTTTTGTGAGTTCTTC
HSP90-K295R	No acetilable	F-GAAGAACTCAACAAAACA Ag GCCGATTGGACGAG R-CTCGTCCAAATCGG Cc TGTTTTGTGAGTTCTTC
MR-S839A	No fosforilable	F-GAGAAGATGCATCAG g CTGCCATGTATGAGCTG R-CAGTCATACATGG C AGcCTGATGCATCTTCTC
MR-S839D	Simula fosforilación	F-GAGAAGATGCATCAG ga TGCCATGTATGAGCTG R-CAGTCATACATGG C AtcCTGATGCATCTTCTC
MR-S839E	Simula fosforilación	F-GAGAAGATGCATCAG gaa GCCATGTATGAGCTG R-CAGTCATACATGG C ttcCTGATGCATCTTCTC
HSD2-K266R	No SUMOilable	F-GCCTGGCTGCTT CAg GACAGAGTCAGTG R-CACTGACTCTGT Cc TGAAGCAGCCAGGC
HSD2-R337C	Mutante AME	F-GCCCGCCG C tGCTATTACCCCGGC R-GCCGGGTAA TAGCa GCGCGGGGC
HSD2-R213C	Mutante AME	F-AGCTCAAGGG C tGCATCGTGACTGT R-CCACAGTCAG TGCa GCCCTTGAG

Tabla 5: Mutantes generados, descripción funcional y cebadores empleados. En rojo se señalan los nucleótidos responsables del cambio de aminoácido y en minúscula el cambio incorporado.

Las construcciones obtenidas se comprobaron mediante secuenciación, utilizando para ello el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y siendo enviadas al Servicio de Secuenciación de la Unidad de Investigación del Hospital Ntra. Señora de la Candelaria para su procesamiento y secuenciación con el Secuenciador Automático ABI Prism modelo 3700 (Applied Biosystems).

3.3 Anticuerpos e inmunoensayos

Los extractos de proteínas fueron obtenidos mediante procesamiento de las células en tampón de lisis en presencia de inhibidores de proteasas (Roche). Las proteínas se separaron mediante electroforesis desnaturizante en SDS (SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y se analizaron mediante *western blot* usando las especificaciones dadas por el fabricante para cada anticuerpo primario en su caso. La detección de MR se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales desarrollados y cedidos por el Dr. Celso Gómez Sánchez (*University of Mississippi*; Gomez-Sanchez et al., 2006). Utilizamos anticuerpos secundarios producidos en cabra y unidos a peroxidasa de rábano (GE Healthcare) para detectar los complejos antígeno-anticuerpo mediante el kit Immun-Star WesternC

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Planteamiento experimental y metodológico

(Biorad) y obtener las imágenes con un equipo de visualización Chemidoc (Biorad). Para examinar la interacción entre proteínas llevamos a cabo la inmunoprecipitación con el kit Pure Proteome Protein A and Protein G Magnetic Beads (Millipore), precipitando la proteína de interés con el anticuerpo primario apropiado unido a esferas magnéticas, para posteriormente detectar por *western blot* las proteínas con las que interacciona. En la tabla 6 se muestran los anticuerpos primarios utilizados para *western blot* y otros inmunoensayos:

Péptido diana	Tipo de anticuerpo	Proveedor	Referencia
MR	Conejo (policlonal)	Santa Cruz	Sc11412
MR	Ratón (monoclonal)	Gomez-Sanchez, C.	Gomez-Sanchez et al., 2006
Actina	Ratón (monoclonal)	Covance	MS1295
GAPDH	Ratón (monoclonal)	Abcam	Ab9484
FLAG	Ratón (monoclonal)	Sigma	F1804
HA	Ratón (monoclonal)	Covance	MMS-101R
HDAC6	Conejo (policlonal)	Santa Cruz	Sc11420
HSD2	Conejo (policlonal)	Santa Cruz	Sc20176
HSP90-K294-Acet.	Conejo (policlonal)	Rockland	600-401-981
HSP90	Ratón (monoclonal)	Calbiochem	386040
GFP	Conejo (policlonal)	Freire, R.	Refolio et al., 2011

Tabla 6: Anticuerpos primarios utilizados en los distintos inmunoensayos.

3.4 PCR en tiempo real (qPCR)

La actividad de MR sobre la regulación de la expresión de genes endógenos fue analizada mediante qPCR en un termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) acoplado al MiniOpticon Real-Time PCR System, con el *software* Bio-Rad CFX Manager v1.6. Las células en cultivo fueron transfectadas con MR o GR en cada caso y tratadas con aldosterona a una concentración de 10 nM durante 2 horas. Se extrajo el RNA con el kit Real Total RNA Spin Plus (Real) y se transformó en cDNA con el kit

42

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

58 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

iScript cDNA Synthesis (Biorad). El cDNA fue utilizado para cuantificar la expresión endógena de la quinasa inducida por suero y glucocorticoides 1 (SGK1). Se utilizó como gen de referencia la β -Actina para llevar a cabo un análisis mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak et al., 2001).

3.5 Localización subcelular y cinética de traslocación nuclear

La determinación de la localización subcelular se llevó a cabo por un método semicuantitativo, basado en el conteo de células y la atribución de MR a una categoría cualitativa: totalmente citosólico o nuclear, mayoritariamente citosólico o nuclear e igualmente distribuido entre citosol y núcleo, expresándose la localización de MR como valor porcentual en cada una de ellas. En ocasiones detectamos las proteínas de interés mediante inmunofluorescencia usando los anticuerpos primarios descritos previamente (Tabla 6). Para ello utilizamos anticuerpos secundarios contra ratón o conejo conjugados con fluoróforos AlexaFluor 488, 594 ó 633 (Invitrogen).

La cinética de traslocación al núcleo inducida por ligando fue analizada mediante microscopía *time-lapse*. Las células transfectadas con una variante fluorescente fueron transferidas a una cámara de perfusión precalentada a 37°C, para añadir la hormona y observar la traslocación *in-vivo* del receptor. Se tomaron imágenes cada dos minutos durante una hora utilizando un microscopio Olympus IX81 con láser multilínea de argón (Olympus Fluoview FV1000) y lámpara de vapor de mercurio para la fluorescencia (Olympus USH1030L). Para el análisis de las imágenes se utilizó el *software* provisto por el fabricante (FV10-ASW 3.1). El aumento en la proporción de fluorescencia nuclear se analizó mediante el ajuste a una curva sigmoide determinada por la ecuación de Boltzmann utilizando el programa Prism (GraphPad):

$$F = F_0 + \left[\frac{F_{max} - F_0}{1 + \exp\left(\frac{t_{1/2} - t}{V_n}\right)} \right]$$

donde F_0 es la fluorescencia inicial en el núcleo, F_{max} es la máxima fluorescencia nuclear alcanzada, $t_{1/2}$ es el tiempo (min) para el cual la fluorescencia nuclear se encuentra a la mitad entre F_0 y F_{max} , y V_n es un factor relacionado con la velocidad de acumulación nuclear de la fluorescencia.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

3.6 Ensayo de ligación *in-situ* por proximidad (PLA)

Para examinar en las células en cultivo la interacción entre proteínas o para detectar la modificación post-traduccional de HSD2 mediante SUMOilación, utilizamos el kit comercial Duolink In Situ Proximity Ligation Assay (Olink Bioscience). Este método se basa en la incubación de la muestra con anticuerpos primarios contra las proteínas de interés (o proteína y modificación) y posterior incubación con anticuerpos secundarios conjugados a unas sondas de DNA, las cuales sólo ligarán entre sí en el caso de que los anticuerpos estuvieran muy próximos. Posteriormente el DNA es amplificado por una polimerasa y detectado mediante sondas fluorescentes específicas para su observación en células fijadas bajo el microscopio confocal. Para el análisis se utilizó el *software* desarrollado por el fabricante (Duolink Image Tool).

3.7 Transactivación con gen reportero

Los experimentos de transactivación génica se realizaron mediante la expresión conjunta de las luciferasas de luciérnaga y *Renilla* como genes reporteros, estando la primera bajo el control de un promotor inducible por MR (GRE2X o MMTV) y la segunda controlada por un promotor constitutivo (SV40). 24 horas tras el tratamiento hormonal se usó el kit Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega), para luego medir de forma consecutiva la luminiscencia producida por cada luciferasa con el luminómetro Victor X5 (Perkin Elmer). Los datos de la luciferasa de luciérnaga se normalizaron con los datos de la luciferasa de *Renilla*, para posteriormente analizar la relación dosis-respuesta mediante un ajuste sigmoide. A partir de estas curvas obtuvimos la potencia (EC₅₀) y eficacia (actividad máxima) del receptor en el rango de concentración de ligando ensayado.

3.8 Ensayo de unión competitiva de radioligando

Para cuantificar la afinidad de unión del ligando a MR realizamos ensayos de unión competitiva en células intactas. Las células transfectadas con el receptor fueron expuestas a una concentración fija de radioligando (³H-aldosterona, Perkin Elmer) en presencia de concentraciones crecientes del mismo ligando no marcado (“frío”) durante 2 horas a 37°C. Se separó la fracción de esteroides unida al receptor mediante lisis con etanol al 80% y tratamiento con carbón activado. El sobrenadante resultante se mezcló con líquido de centelleo High Performance LSC Cocktail (Sigma) y se midió la radiactividad en un contador LKB Wallac 1214. La unión específica se calculó

44

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

60 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

sustrayendo las desintegraciones por minuto (dpm) obtenidas en presencia de un exceso de ligando frío 100 veces superior a la concentración del radioligando. Se calculó la concentración media inhibitoria (IC₅₀) mediante el ajuste con el software Prism 5 (GraphPad). La constante de disociación (Kd) se obtuvo con la ecuación de Cheng-Prussoff,

$$Kd = Ki = IC_{50} - [\text{radioligando}]$$

asumiendo que la afinidad del ligando marcado y no marcado es la misma con lo que la Kd es igual a la constante de inhibición (Ki).

3.9 Análisis de la actividad enzimática de HSD2

Llevamos a cabo un análisis de la actividad enzimática de HSD2 detectando la conversión de cortisol en cortisona en células en cultivo. Para ello las células fueron transfectadas con las distintas construcciones analizadas, añadiéndose posteriormente distintas concentraciones de cortisol durante diferentes tiempos. Al finalizar el experimento se cuantificó la cantidad de proteína presente en las células mediante el método de Bradford. Se extrajeron los esteroides presentes en el medio con etil acetato grado HPLC (Fisher). Se secó la fracción orgánica calentando a 60°C bajo una corriente de nitrógeno y se diluyeron los esteroides en acetonitrilo al 30% (fase móvil de la cromatografía). La fase móvil con los esteroides presentes se analizó mediante cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en un espectrómetro de masas AB SCIEX seleXION para obtener la cantidad absoluta de cortisol y cortisona presente. La actividad enzimática se calculó como cantidad de cortisona generada por unidad de tiempo, normalizada por la cantidad total de proteína en la muestra. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten con el *software* Prism 5 (GraphPad), obteniendo el valor de la constante de Michaelis (Km) y la velocidad máxima (v_{max}):

$$y = \left[\frac{v_{max} * x}{Km + x} \right]$$

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

63 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

63 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

4. ARTÍCULOS PUBLICADOS

- 4.1 Jimenez-Canino, R.,** Lorenzo-Diaz, F., Jaisser, F., Farman, N., Giraldez, T., & Alvarez de la Rosa, D. (2016). Histone Deacetylase 6-Controlled Hsp90 Acetylation Significantly Alters Mineralocorticoid Receptor Subcellular Dynamics But Not its Transcriptional Activity. *Endocrinology*, *Jun*;157(6):2515-32, en20152055.
- 4.2 Jimenez-Canino, R.,** Fernandes, M. X., & Alvarez de la Rosa, D. (2016). Phosphorylation of Mineralocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Impairs Receptor Activation and Has a Dominant Negative Effect over Non-phosphorylated Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *Sep* 2;291(36):19068-78, jbcM116718395.
- 4.3** Gravez, B., Tarjus, A., **Jimenez-Canino, R.,** El Moghrabi, S., Messaoudi, S., Alvarez de la Rosa, D., & Jaisser, F. (2013). The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes. *PLoS One*, *Sep* 9;8(9), e73737.

(Ver artículos originales en Anexo 1)

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

67 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

67 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

5. ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN

5.1 Jimenez-Canino, R., Lorenzo-Díaz, F., Bailey M. A., Livingstone, D. E., Jaisser, F., Farman, N., & Alvarez de la Rosa, D. (manuscript in press). SUMOylation of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Regulates Cortisol-dependent Mineralocorticoid Receptor Activity.

(Ver texto y figuras en Anexo 2)

53

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

69 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

71 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 La acetilación de HSP90 como posible modulador de la actividad específica de tejido de MR

En este trabajo publicado (Jimenez-Canino et al., 2016a), estudiamos como la regulación de la actividad de HSP90 mediante la acetilación de su residuo K294 altera la localización, dinámica subcelular, traslocación nuclear y actividad transcripcional de MR. Para ello utilizamos el mutante HSP90-K295Q, que simula la acetilación presentando actividad disminuida, y el mutante no acetilable HSP90-K295R (Scroggins et al., 2007; el residuo K295 en la secuencia de HSP90 de ratón es equivalente al residuo K294 de HSP90 de humanos). Para manipular la acetilación endógena de HSP90 utilizamos la construcción HDAC6wt, con actividad desacetilasa previamente demostrada sobre el residuo K294 de HSP90, y el mutante HDAC6dm (H216A/H611A) sin actividad catalítica (Valenzuela-Fernandez et al., 2005). Tomados en su conjunto, los resultados de este trabajo demuestran que la acetilación de HSP90 regulada por HDAC6 altera la dinámica celular de MR pero no su función, lo que contrasta con la regulación que se ejerce sobre GR. Esto sugiere que la acetilación de HSP90 podría constituir un punto de control sobre la actividad relativa de MR y GR en células que coexpresen ambos receptores.

6.1.1 La acetilación de HSP90 altera la localización subcelular de MR en ausencia de ligando

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran como la abundancia de HSP90 resulta fundamental para el control de la localización subcelular de MR (Hernandez-Diaz et al., 2010). Por ello decidimos estudiar este parámetro en condiciones que alteran la actividad de HSP90, concretamente por acetilación del residuo K295. Para estudiar la localización subcelular de MR en presencia o ausencia de aldosterona y su traslocación al núcleo, llevamos a cabo diferentes aproximaciones en distintas líneas celulares, mediante la coexpresión de MR con distintos mutantes de HSP90 o mediante la manipulación del nivel de acetilación de la proteína endógena. En la línea celular COS-7 (Gluzman, 1981), la localización principalmente citosólica de MR se ve alterada hacia una mayor localización nuclear en presencia del mutante con actividad disminuida HSP90-K295Q, mientras que ésta no presenta cambios en

57

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

73 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

presencia de los mutantes considerados plenamente activos HSP90wt o HSP90-K295R (Fig. 1; Jimenez-Canino et al., 2016a). En la línea celular HL-1 (Claycomb et al., 1998), MR presenta una localización principalmente nuclear, debido al bajo nivel endógeno de HSP90 (Hernandez-Diaz et al., 2010). Mediante sobreexpresión de construcciones con actividad normal o aumentada de HSP90 (HSP90wt o HSP90-K295R), la localización nuclear se revierte a una localización citosólica, mientras que el mutante HSP90-K295Q no es capaz de producir este efecto (Fig. 2; Jimenez-Canino et al., 2016a). En conjunto los datos sugieren que la localización de MR depende de la acetilación de HSP90 en K295 y no sólo de la abundancia de la chaperona, como describió previamente nuestro laboratorio en el trabajo de Hernandez-Diaz et al. (2010). En ausencia de hormona, el efecto funcional de la desacetilación del residuo K295 de HSP90 contribuye a la retención de MR en el citosol.

El aumento de la acetilación de HSP90 endógena en células COS-7 mediante el uso de la construcción HDAC6dm, con actividad dominante negativa, provoca el mismo efecto sobre la localización subcelular de MR que la construcción que simula acetilación (HSP90-K295Q), de forma que el receptor pasa de ser predominantemente citosólico a nuclear (Fig. 3; Jimenez-Canino et al., 2016a). El efecto de HDAC6dm podría deberse a la disminución de la acetilación de otras proteínas. Sin embargo, la coexpresión del mutante no acetilable HSP90-K295R fue capaz de revertir el efecto de HDAC6dm, demostrándose así que el efecto de la desacetilasa se debe a su actividad sobre el residuo K295 de HSP90 y no a la desacetilación de otras proteínas. (Fig. 3; Jimenez-Canino et al., 2016a).

Para confirmar el papel de HDAC6 sobre la localización de MR a través de la regulación de la acetilación de HSP90, disminuimos la expresión de esta enzima en la línea COS-7 mediante el uso de RNA interferente específico (siRNA-HDAC6), consiguiendo aproximadamente un descenso del 50% en su nivel de expresión (Fig. 4 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016a). Al estudiar la localización subcelular de MR en estas condiciones obtuvimos resultados consistentes con los experimentos anteriores. La disminución de la expresión de HDAC6 modifica la distribución del receptor hacia una localización más nuclear, lo que puede explicarse por la pérdida de actividad de HSP90 por su acetilación (Fig. 4 C; Jimenez-Canino et al., 2016a). Esta idea se confirmó mediante la cotransfección de HSP90-K295Q, que produjo la reversión del efecto

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

producido por el siRNA-HDAC6 (Fig. 4 C; Jimenez-Canino et al., 2016a), volviéndose a obtener una localización de MR mayoritariamente citosólica. Por último, la inhibición farmacológica de histona-deacetilasas de clase I y clase II (que incluye a HDAC6) mediante el tratamiento con 1 μ M de TSA produce un desplazamiento de la localización de MR hacia el núcleo, confirmando que la actividad de HDAC6 es responsable de la regulación de la localización subcelular de MR dependiente de la acetilación de HSP90 (Fig. 4 C; Jimenez-Canino et al., 2016a).

Con el objetivo de comprobar si el efecto de la acetilación de HSP90 sobre la localización subcelular de MR depende de la interacción física entre ambas proteínas, llevamos a cabo un ensayo de ligación por proximidad (*proximity ligation assay*, PLA). Los datos revelan un 35% de disminución en la interacción de HSP90-K295Q y MR en comparación con el control *wild type* (Fig. 5; Jimenez-Canino et al., 2016a). En conclusión, la acetilación de HSP90 interrumpe solo parcialmente la interacción de la chaperona con MR.

En conjunto, los datos demuestran que la acetilación de HSP90 en su residuo K295, controlada por HDAC6, modula la distribución subcelular de MR en ausencia de ligando, al menos en parte disminuyendo la interacción de la chaperona con el receptor.

6.1.2 La acetilación de HSP90 modifica la cinética de traslocación nuclear de MR

La adición de ligando, aldosterona o glucocorticoides en el caso de MR, produce que los receptores nucleares se desplacen completamente al núcleo (Marcelli et al., 2006). Con objeto de estudiar si la acetilación de HSP90 regula la cinética de traslocación al núcleo de MR utilizamos células COS-7 cotransfectadas con MR-147-GFP y las distintas construcciones de HSP90, mediante microscopía en tiempo real (*time lapse microscopy*). Tanto al expresar MR por sí solo como en presencia de las distintas construcciones de HSP90, observamos cómo se produce una traslocación completa del receptor dentro de la primera hora tras la adición de aldosterona a concentración 10 nM (Fig. 6 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016a). Sin embargo, existen diferencias en los parámetros cinéticos de la traslocación. El tiempo medio para la traslocación en presencia de HSP90-K295Q es menor en comparación con las demás condiciones experimentales (Fig. 6 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016a), demostrando que la

59

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

75 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

velocidad en los pasos iniciales de la traslocación de MR mediada por HSP90 depende de la acetilación de HSP90-K295, aunque el efecto final de una traslocación completa durante la primera hora tras la adición de aldosterona no se vea alterado. Este efecto es consistente con la actividad funcional de HSP90 de retención de MR en el citosol, permitiendo mediante su acetilación un comienzo más temprano del movimiento del receptor al núcleo.

6.1.3 La acetilación de HSP90 tiene un efecto diferencial sobre la actividad transcripcional de MR y GR

A continuación, estudiamos el efecto de la acetilación de HSP90 sobre la función de transactivación de MR y la comparamos con la represión de la función de GR, previamente descrita (Murphy et al., 2005). Realizamos curvas dosis-respuesta de transactivación en distintas líneas celulares mediante ensayos de actividad del gen reportero luciferasa bajo el control de distintos promotores sintéticos y naturales previamente caracterizados como dianas de MR. Los datos revelan que ni el mutante HSP90-K295Q, que simula la acetilación de la proteína, ni el efecto de sobreacetilación de HSP90 endógena producido por la presencia de HDAC6dm o el siRNA-HDAC6, alteran la afinidad aparente de MR por aldosterona ni la eficacia del receptor para ejercer su actividad transactivadora sobre el promotor sintético GRE2x en células COS-7 (Fig. 7 A, B y C; Jimenez-Canino et al., 2016a). En cambio, el mismo ensayo para testar la actividad transactivadora de GR en presencia del glucocorticoide sintético dexametasona, aumentando la acetilación de HSP90 mediante el uso de siRNA-HDAC6, sí produjo el efecto esperado de disminución en la actividad transcripcional (Fig. 7 D; Jimenez-Canino et al., 2016a).

Estos ensayos se repitieron en la línea celular HL-1, que presenta niveles bajos de expresión endógena de HSP90. La utilización de siRNA-HDAC6 no produjo ningún efecto para la capacidad transactivadora de MR inducida por aldosterona, mientras que el efecto sobre la actividad GR-dexametasona se repitió de forma consistente con los anteriores ensayos (Fig. 7 E y F; Jimenez-Canino et al., 2016a).

Testamos también el papel de la acetilación de HSP90 en la regulación diferencial de la capacidad transactivadora para MR y GR del promotor natural del gen NGAL, previamente descrito como diana de ambos receptores (Latouche et al. 2012). Los

60

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

76 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

resultados obtenidos tanto con la línea celular COS-7, como con HL-1, confirman el mismo efecto de disminución de la actividad para GR, mientras que MR no se ve afectado (Fig. 8 A, B, C y D; Jimenez-Canino et al., 2016a).

Utilizamos también un ensayo de qPCR para estudiar la regulación de la expresión de SGK1, un gen diana de MR y GR, en presencia de siRNA-HDAC6. Tras una inducción de 2 horas con aldosterona 10 nM o dexametasona 100 nM en la línea COS-7 transfectadas con MR o GR respectivamente, el análisis de los resultados muestra que el aumento de expresión de SGK1 por MR/aldosterona no se altera por el siRNA-HDAC6, mientras que el efecto de GR/dexametasona se ve disminuido (Fig. 8 E y F; Jimenez-Canino et al., 2016a). Estos datos son consistentes con los efectos anteriores de regulación diferencial para MR y GR debido a la acetilación de HSP90.

Tomados en su conjunto, estos experimentos demuestran como la acetilación de HSP90 dependiente de HDAC6 no afecta a la transactivación de genes diana de MR, mientras que la disminución de la actividad de GR sugiere un mecanismo de regulación de la actividad relativa de ambos receptores en presencia de glucocorticoides. La ausencia de efecto de la acetilación de HSP90 sobre la actividad de MR contrasta con lo publicado para receptores de esteroides relacionados con él, tanto para AR, como especialmente para GR, como hemos demostrado en este trabajo. Para GR se describe como la acetilación de HSP90 afecta a la unión de cortisol, a la traslocación y a la actividad transcripcional, pudiéndose explicar este conjunto de efectos por desensamblaje de los complejos de GR con la chaperona, quedando menor cantidad de GR disponible para unir cortisol. Sin embargo, el efecto de acetilación de HSP90 sobre MR no había sido estudiado previamente. Se podría pensar que la acetilación de HSP90 debería producir efectos similares a los obtenidos por inhibición farmacológica de la chaperona (Faresse et al., 2010). Sin embargo, en contraste con el citado trabajo, no observamos diferencias en la abundancia de MR, mientras que la localización subcelular se vuelve predominantemente nuclear y la traslocación al núcleo de los receptores citosólicos se ve afectada de forma que se inicia más rápidamente. En cuanto a la actividad del receptor, es importante destacar que el efecto diferencial de regulación en la actividad para MR y GR lo hemos encontrado en ensayos de luciferasa realizados tras tiempos largos de exposición al ligando (aprox. 16 horas). Sin embargo a tiempos cortos estos ensayos pierden sensibilidad. Es necesario destacar que la respuesta transcripcional

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

clásica mediada por aldosterona tiene importancia a partir de 1-2 horas tras el aumento de la concentración circulante de la hormona. Por ello comprobamos mediante qPCR el efecto de la acetilación de HSP90 sobre la regulación de SGK1 tras un tratamiento de 2 horas con los ligandos, obteniendo los mismos resultados que con los experimentos de luciferasa. Esto no elimina la posibilidad de que pueda haber algún tipo de efecto más temprano, sobre otros genes o sobre respuestas no genómicas (Harvey et al., 2008).

6.1.4 La localización de la acetilación de HSP90 sugiere su importancia en la modulación de MR/GR en células de músculo liso vascular

Con objeto de investigar la posible relevancia fisiológica de la acetilación de HSP90 sobre la regulación de MR y GR estudiamos la presencia de esta modificación post-traduccional en distintos tejidos de rata, concretamente en riñón y corazón, tejidos donde la actividad de MR juega un papel importante. Dicha acetilación fue encontrada de forma clara en riñón en arterias y arteriolas intracorticales, con un patrón de localización de HSP90 acetilada en K295 en células de músculo liso, pero no en nefronas. Como control, realizamos tinciones con un anticuerpo anti-MR, que reveló, según se esperaba, la presencia del receptor en la nefrona distal, pero no en los túbulos proximales (Fig. 9 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016a). En corazón encontramos la modificación de HSP90 en las células de músculo liso de arterias coronarias, mientras que detectamos MR en el núcleo de los cardiomiocitos (Fig. 9 D y E; Jimenez-Canino et al., 2016a). Estos datos sugieren que las células vasculares de músculo liso son relevantes por la presencia de HSP90 acetilada en K295, siendo un posible tejido diana de la regulación diferencial de la actividad de MR y GR en presencia de la modificación de la chaperona, ya que las células de músculo liso expresan ambos receptores (Nguyen et al., 2011), si bien la cantidad de MR es baja y no se detecta en los ensayos realizados en este trabajo.

Para determinar el efecto funcional en este tipo de células donde existe una prominente acetilación de HSP90, utilizamos la línea de células vasculares de músculo liso A-10 (Tsugita et al., 2008), donde determinamos la actividad de MR y GR sobre la actividad de los promotores GRE2x y NGAL. La disminución de la expresión de HDAC6 mediante siRNA produjo en todos los casos una disminución de la actividad de GR mientras que MR no se vio afectado (Fig. 10 A, B, C y D; Jimenez-Canino et al., 2016a). La inducción de SGK1 también fue estudiada mediante qPCR (Fig. 10 E y F;

62

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

78 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdvrOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Jimenez-Canino et al., 2016a), arrojando una vez más los mismos resultados consistentes con todos los experimentos anteriores realizados sobre las líneas celulares COS-7 y HL-1. Estos datos sugirieron que el efecto diferencial de la acetilación de HSP90 sobre la regulación de MR y GR no depende del contexto celular.

Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que la acetilación de HSP90 en el residuo K295 puede jugar un papel importante para regular la actividad de MR y GR en tejidos donde se coexpresan, minimizando la transactivación de genes diana de GR mientras que se aumentan los de MR. Esto podría resultar interesante particularmente en células con baja expresión de HSD2, fuera de los tejidos diana clásicos del complejo MR-aldosterona, donde MR puede ser activado por glucocorticoides. Un ejemplo de ello son las células de músculo liso vascular, donde hemos demostrado que existe un alto nivel de acetilación de HSP90, y donde ello podría conferir especificidad a la acción de los glucocorticoides sobre MR y GR, ya que sabemos que sus funciones fisiológicas no son intercambiables (Farman et al. 2001).

Éste fenómeno diferencial de regulación también podría ser importante en tejidos diana de la aldosterona, ya que la expresión de GR es más abundante y HSD2 podría no ser suficiente para eliminar completamente el cortisol, existiendo una activación residual de MR por parte de glucocorticoides. En este caso la acetilación de HSP90 representaría un mecanismo que podría conferir especificidad a la acción de mineralocorticoides y glucocorticoides sobre MR y GR respectivamente. Es importante resaltar que la variación en la acetilación o desacetilación de HSP90 debido a mecanismos fisiológicos de regulación de la actividad de HDAC6 son todavía desconocidos, así como la posible existencia de especificidad de tejido en ellos. El estudio de estos mecanismos podría esclarecer el papel de la regulación diferencial de la actividad de MR y GR encontrada en este trabajo.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

6.2 Regulación de la actividad de MR mediante la SUMOilación de HSD2

En este trabajo actualmente en proceso de publicación (anexo 2), demostramos la SUMOilación de HSD2 en el residuo K266. Profundizamos en los efectos funcionales de dicha modificación mediante el análisis de la traslocación nuclear de MR y su actividad transcripcional inducidas por cortisol, siguiendo el razonamiento de que la presencia de HSD2 impide al menos en parte la activación del receptor por glucocorticoides y que cualquier alteración en la actividad de la enzima se vería reflejada en la activación de MR por estas hormonas. Para ello sobreexpresamos en células COS-7 la proteína HSD2 nativa, el mutante no SUMOilable HSD2-K266R o varias mutaciones presentes en pacientes hipertensos por el síndrome AME, incluyendo HSD2-R337C (Ferrari et al., 1996) y HSD2-R213C (Manning et al., 2010). Por otra parte, estudiamos el efecto de cotransfectar la deSUMOilasa SENP-1 sobre el sistema. Así mismo, analizamos la actividad de conversión de cortisol en cortisona de HSD2 nativa y del mutante no SUMOilable K266R. Los datos revelan que la SUMOilación de HSD2 en el residuo K266 altera la capacidad de la enzima de prevenir la traslocación nuclear de MR inducida por cortisol. Sin embargo, este MR nuclear presenta una actividad disminuida, lo que se correlaciona con una menor capacidad de reclutamiento del coactivador transcripcional SRC-1. Por otra parte, los ensayos de actividad enzimática no revelaron alteraciones importantes en el mutante K266R, lo que dificulta la explicación de la capacidad de cortisol de traslocar MR en presencia de HSD2-K266R. Hipotetizamos que podría existir una interacción física directa o indirecta entre MR y HSD2, dependiente de la SUMOilación de ésta última y determinante para regular la conformación adecuada del receptor que regula su capacidad de traslocación y el reclutamiento apropiado de coactivadores.

6.2.1 HSD2 está SUMOilada en la lisina 266

Mediante el *software* de predicción GPS-SUMO (Zhao et al., 2014) detectamos la presencia de un sitio consenso de SUMOilación de alta probabilidad en torno a la lisina 266 de la secuencia de HSD2 humana, bien conservado en otras especies examinadas, con la única excepción del cerdo (Fig. 1; manuscrito en preparación). Es de interés notar que existen también motivos de interacción no covalente con SUMO (SIM), especialmente el presente en la secuencia entre los aminoácidos 214 y 218 de humano, que se conserva bien entre especies, o entre los aminoácidos 58 y 62 en el caso de roedores y cerdo (Tabla S1; manuscrito en preparación).

64

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

80 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Evaluamos la SUMOilación de HSD2 en la línea celular COS-7 transfectada con HSD2-WT o K266R junto a un plásmido con expresión de SUMO1-GFP. Para ello realizamos la inmunoprecipitación de la proteína HSD2 seguida de la detección de SUMO mediante *western blot* utilizando un anticuerpo anti-GFP. Detectamos claramente la SUMOilación de HSD2-WT, mientras que el HSD2-K266R también resultó positivo para SUMOilación, aunque con menor intensidad de señal (Fig. 2; manuscrito en preparación). Estos datos sugieren que la proteína HSD2 está SUMOilada y que la mayor parte de esta modificación ocurre en el residuo K266, si bien podría existir SUMOilación adicional bien en motivos que se desvían del consenso o bien a través de los SIM, siendo en este último caso una interacción resistente a la desnaturalización.

Para llevar a cabo un análisis cuantitativo de la SUMOilación realizamos un ensayo de PLA entre HSD2-WT o K266R y SUMO1 (Fig. 3; manuscrito en preparación). Obtuvimos aproximadamente un 75% de disminución de la señal de proteína SUMOilada para el caso de HSD2-K266R en comparación con la proteína nativa, confirmando los resultados obtenidos mediante IP-*western blot* y demostrando que el principal residuo SUMOilado en HSD2 es K266. Es interesante notar que pese a la distribución predominantemente nuclear de SUMO1, la cantidad de péptido presente en el citosol es suficiente para modificar HSD2, como ya se ha demostrado para otras proteínas citosólicas o situadas en la membrana plasmática (Fig. 3 A y B; manuscrito en preparación). Además de estudiar el efecto de la mutación K266R sobre el nivel de SUMOilación de HSD2, comprobamos el efecto de la coexpresión de la deSUMOilasa SENP1. Esta enzima redujo la SUMOilación de la proteína nativa aproximadamente en un 80%, hasta un nivel estadísticamente igual al caso del mutante no SUMOilable K266R (Fig. 3C; manuscrito en preparación). El hecho de que la señal residual de SUMOilación detectada mediante la mutación K266R sea también resistente al tratamiento enzimático con SENP-1 sugiere que se podría deber a una interacción no covalente a través de motivos SIM.

6.2.2 Influencia de SUMO sobre la actividad enzimática de HSD2

Para comprobar si la SUMOilación afecta a la abundancia de proteína, comprobamos la expresión de distintos mutantes de HSD2 transfectados en células COS-7, incluyendo la enzima nativa, el mutante no SUMOilable K266R y los mutantes AME R213C y

65

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

81 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

R337C (Fig. 4A; manuscrito en preparación). Sólo observamos cambios significativos de la expresión del mutante HSD2-R337C, que se ve fuertemente disminuida hasta aproximadamente un 20% de los niveles de la proteína nativa (Fig. 4B; manuscrito en preparación), sugiriendo que parte de la pérdida de actividad puede deberse a su débil expresión, según se ha propuesto anteriormente (Ferrari et al., 1996).

Medimos de forma directa la actividad de HSD2, con el objetivo de determinar si el mutante no SUMOilable presenta alteraciones en su capacidad de metabolizar cortisol. Medimos la conversión de cortisol en cortisona en células COS-7 intactas cuantificando la presencia de ambos esteroides mediante espectrometría de masas. La comparación del metabolismo de cortisol a concentración 300 nM entre células no transfectadas y transfectadas con HSD2-WT mostró un comportamiento lineal de la conversión de cortisol en cortisona durante las primeras 4 horas tras la adición de la hormona, mientras que las células no transfectadas mostraron nula o baja conversión de cortisol, siendo menor al 1% con el tratamiento a 4 horas (Fig. 5A; manuscrito en preparación). Este experimento confirmó que en estas células no existe conversión inespecífica del esteroide y proporcionó además el marco temporal en el cuál se puede analizar de forma lineal la actividad enzimática.

Con objeto de determinar los parámetros cinéticos de la actividad enzimática de HSD2-WT y el mutante K266R, estudiamos la generación de cortisona tras la incubación durante 30 minutos con concentraciones crecientes de cortisol. Los valores experimentales se utilizaron para el ajuste a una curva de Michaelis-Menten, que proporcionó los parámetros K_m y V_{max} . Obtuvimos para HSD2-WT una K_m de 563,4 nM y para HSD2-K266R una K_m de 375,9 nM, demostrándose así un ligero aumento de afinidad en el mutante. Por otra parte, la V_{max} obtenida con ambas formas fue de 573,5 y 394,9 pmol/hora/mg de proteína respectivamente, mostrando que el mutante no SUMOilable presenta una disminución del 69% en su capacidad máxima de conversión de cortisol (Fig. 5B y C; manuscrito en preparación). Además comparamos la actividad enzimática alcanzada a 100 y 500 nM de cortisol, concentraciones utilizadas en los experimentos de traslocación y que se encuentran dentro del rango fisiológico del esteroide en plasma, obteniendo un aumento de la actividad para HSD2-K266R del 40% a 100 nM, mientras que no se ven cambios a la concentración de 500 nM (Fig. 5B y D; manuscrito en preparación).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Para descartar posibles sesgos en la determinación de la actividad enzimática debido a una limitación en la cantidad disponible del cofactor NAD, necesario para la reacción de transformación de cortisol en cortisona, comparamos el metabolismo de cortisol en presencia o ausencia de NAD añadido exógenamente a las concentraciones de cortisol de 100 nM y 500 nM, sin que se obtuvieran diferencias significativas dependientes de la adición de NAD (Fig. 5E; manuscrito en preparación). La cuantificación de la expresión de HSD2-WT o K266R mediante *western blot* muestra además que no existen diferencias en la expresión que pueda causar los cambios obtenidos (Fig. 5F y G; manuscrito en preparación).

Adicionalmente utilizamos un método alternativo para determinar la actividad de HSD2. Cuantificamos el porcentaje de conversión de ³H-corticosterone 10 nM en ³H-11-dehydrocorticosterone durante 30 minutos de incubación mediante HPLC (Fig. 5H). Obtuvimos un porcentaje de conversión del 12,24% para la enzima nativa y un 12,72% para el mutante K266R, consistente con los datos obtenidos mediante espectrometría de masas.

Los datos descritos sugieren leves cambios en la actividad enzimática de los constructos ensayados *in vivo*, consistente con una mayor afinidad del mutante no SUMOilable K266R que le permite funcionar incluso más eficientemente para degradar cortisol a una concentración de 100 nM comparado con la enzima nativa. En conjunto, los datos muestran alteraciones leves de la actividad de HSD2 a concentraciones fisiológicas.

6.2.3 La SUMOilación de HSD2 regula la traslocación nuclear de MR inducida por cortisol

Para determinar si la SUMOilación en K266 presenta algún efecto sobre la función de HSD2 nos preguntamos si el mutante no SUMOilable K266R disminuye la capacidad de HSD2 para eliminar cortisol, impidiendo la traslocación nuclear de MR inducida por esta hormona en células COS-7, las cuales no tienen expresión endógena de la deshidrogenasa (Fig. 2, 4 y 5). En ausencia de ligando la localización de MR es predominantemente citoplasmática, independientemente de la cotransfección con HSD2-WT, K266R o los mutantes AME R337C ó R213C, ninguno de los cuales tiene efecto sobre la localización del receptor (Fig. 6A y B; manuscrito en preparación). El tratamiento durante 24 horas con cortisol 100 nM en ausencia de HSD2 indujo la

67

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

83 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

traslocación completa del receptor al núcleo en la mayoría de las células. La coexpresión de HSD2 produjo el efecto esperado de impedir la traslocación, manteniendo una distribución predominantemente citoplasmática de MR (Fig. 6C y D; manuscrito en preparación). El mutante no SUMOilable K266R ó el mutante AME R337C no impidieron la traslocación del receptor, mostrando un efecto consistente con la pérdida de función de HSD2 (Fig. 6C y D; manuscrito en preparación). La utilización de una concentración más elevada de cortisol (500 nM) produjo la traslocación completa del receptor en todos los casos estudiados (Fig. 6E y F; manuscrito en preparación), efecto consistente con la saturación de la enzima nativa. Con el objetivo de comprobar si el efecto de la mutación K266R sobre la traslocación de MR inducida por 100 nM de cortisol es debida a la pérdida de SUMOilación o bien se debe a otras alteraciones (pérdida de otras modificaciones post-traduccionales dependientes de lisina o alteración estructural de la enzima), coexpresamos la deSUMOilasa SENP-1 en presencia de la proteína nativa funcional HSD2-WT. La presencia de SENP-1 permitió la traslocación nuclear de MR por 100 nM cortisol en presencia de HSD2-WT, demostrándose así que el fenómeno detectado depende específicamente de la SUMOilación de K266 y no del resto de posibles efectos inducidos por la mutación de este residuo (Fig. 6G y H; manuscrito en preparación).

Dado que los experimentos de localización subcelular descritos se realizan en estado estacionario, decidimos estudiar si la SUMOilación de HSD2 altera la cinética de traslocación al núcleo de MR dependiente de cortisol. En la primera hora tras la adición de cortisol 100 nM se observa la traslocación completa del receptor, según se ha descrito anteriormente. Como era esperable, HSD2-WT previene drásticamente el importe nuclear (Fig. 7A y B; manuscrito en preparación). Sin embargo, la coexpresión del mutante no SUMOilable K266R o el mutante AME R337C no impidieron la traslocación nuclear, mostrando un comportamiento indistinguible de la condición control y sugiriendo la pérdida de función de la enzima (Fig. 7A y B; manuscrito en preparación).

En conjunto, los datos muestran un efecto de regulación de la traslocación nuclear mediante la SUMOilación de HSD2 en la lisina 266, consistente con una alteración de la actividad enzimática de HSD2 dependiente de la SUMOilación en dicho residuo.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

6.2.4 Efecto de la SUMOilación de HSD2 sobre la actividad transcripcional de MR y su unión con coactivadores

Para determinar si la SUMOilación de HSD2 afecta a la actividad transcripcional dependiente de MR se realizaron curvas dosis-respuesta de activación por cortisol en células COS-7 cotransfectadas con MR y el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor sintético GRE2x. El tratamiento con concentraciones crecientes de cortisol dio como resultado una EC_{50} de 40 nM para MR en ausencia de HSD2 (Fig. 8A; manuscrito en preparación). La coexpresión de los mutantes AME R337C ó R213C no alteraron significativamente la afinidad aparente de MR por cortisol, lo que es consistente con la presencia de variantes no funcionales de HSD2. La expresión de HSD2-WT mostró una disminución de la eficacia transcripcional y la afinidad aparente en el rango ensayado (EC_{50} aproximadamente dos órdenes de magnitud superior al control), consistente con la degradación de cortisol y el impedimento de la traslocación nuclear. Sin embargo, el mutante no SUMOilable de HSD2, K266R, también disminuyó la eficacia y afinidad aparente de MR aproximadamente dos órdenes de magnitud, comportándose como la construcción funcional HSD2-WT (Fig. 8A; manuscrito en preparación). Este experimento pone de manifiesto que si bien el mutante HSD2-K266R permite la traslocación nuclear de MR inducida por cortisol, este receptor es incapaz de promover la actividad transcripcional de forma apropiada, sugiriendo un desacoplamiento entre la traslocación y la transactivación de genes dependiente de la activación de MR por cortisol. Por ello, proponemos que la SUMOilación de HSD2 en la lisina 266 presenta un efecto funcional adicional sobre MR, ya que si bien permite la traslocación del receptor impide la activación adecuada del mismo.

Para asegurar que el efecto anterior es específico de ligando, atribuyendo el efecto de la SUMOilación sobre la lisina 266 a la actividad de MR dependiente de cortisol, realizamos curvas dosis-respuesta con aldosterona en presencia de los distintos constructos de HSD2, obteniendo un resultado igual en todas las condiciones, con una afinidad aparente aproximada de 0,1 nM (Fig. 8B; manuscrito en preparación). Además, con el objetivo de asegurar que las diferencias en la actividad transcripcional del receptor no se deben a cambios en su nivel de expresión, detectamos mediante *western blot* la abundancia del receptor, que no está alterada en las distintas condiciones ensayadas (Fig. 8C y D; manuscrito en preparación).

69

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

85 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Para profundizar en el mecanismo por el cual la SUMOilación de HSD2 altera la actividad transcripcional de MR, ensayamos la interacción de MR con SRC-1, un coactivador transcripcional bien conocido de MR. Para ello llevamos a cabo un ensayo de PLA en presencia o ausencia de cortisol en células COS-7 cotransfectadas con MR y SRC-1, obteniendo una interacción nuclear positiva dependiente de cortisol (Fig. 9; manuscrito en preparación). La coexpresión de HSD2-WT o el mutante K266R redujo el nivel de la señal en torno a un 60% (Fig. 9B y C; manuscrito en preparación), confirmando que la mutación K266R previene la interacción eficiente de MR con SRC-1. Este efecto explica, al menos en parte la alteración de la actividad transcripcional de MR por la SUMOilación de HSD2 dependiente de su activación por cortisol.

Los datos de traslocación inducida por cortisol, los datos de actividad de MR y los resultados de actividad enzimática de HSD2 resultan difíciles de reconciliar. Una explicación que podría satisfacer la traslocación nuclear de MR obtenida en presencia de HSD2 no SUMOilada, con el hecho añadido de que su actividad enzimática no se ve fuertemente alterada, estaría basada en la existencia de cambios conformacionales de MR, inducidos por la ausencia de SUMO en HSD2 y que serían suficientes para permitir la traslocación del receptor a concentraciones muy bajas de cortisol, pero no su activación. La posibilidad de que exista un desacoplamiento entre la traslocación y la activación del receptor podría basarse en las diferencias previamente observadas en el tiempo de permanencia de cada ligando en el LBD de MR, siendo más corto para el caso del cortisol, lo que impediría estabilizar apropiadamente el cambio conformacional requerido para el reclutamiento de coactivadores (Farman et al. 2001). Este hecho es importante fisiológicamente, ya que HSD2 es incapaz de metabolizar completamente el cortisol a las concentraciones fisiológicas, especialmente en los picos más altos de concentración que se presentan durante el ritmo circadiano seguido por la concentración fisiológica de cortisol en mamíferos (Lombes et al., 1994). En cualquier caso, para que cambios inducidos por la falta de SUMOilación de HSD2 se transmitan eficientemente en cambios conformacionales de MR, debe existir alguna interacción entre ambas proteínas, ya sea de forma directa o indirecta, cosa que ya ha sido sugerida (Odermatt et al., 2001), que permita la comunicación entre ambas proteínas, de forma que la ausencia de SUMOilación puede sensibilizar a MR para su traslocación nuclear pero evitar la conformación necesaria para un reclutamiento efectivo de coactivadores por parte del receptor.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Una opción alternativa, pero consistente con la idea de la sensibilización de MR a la traslocación, sería la posible inducción de este proceso por la cortisona resultante de la actividad de HSD2. En estas condiciones, la ausencia de SUMOilación de HSD2 haría que MR pueda ser traslocado por la acción de la cortisona, si bien ésta molécula es incapaz de inducir una conformación que pueda reclutar coactivadores. Esta posibilidad merece ser explorada, aunque se ha demostrado previamente que la afinidad de MR por cortisona es muy baja en condiciones normales.

La posibilidad de interacción entre MR y HSD2 y su naturaleza continúan siendo desconocidas. Por ello, decidimos intentar detectar dicha interacción mediante la técnica de PLA. Los resultados obtenidos fueron negativos, de forma que no hemos podido demostrar una interacción directa. Es posible que MR y HSD2 interaccionen a través de un complejo proteico mayor. Alternativamente, el hecho de que al igual que HSD2, MR también presente motivos de interacción no covalente con SUMO podría explicar interacciones transitorias difíciles de detectar mediante métodos rutinarios.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

6.3 Regulación de MR por fosforilación en el dominio de unión al ligando

Recientemente se ha descrito la fosforilación de MR en el residuo S843 (Shibata et al., 2013) situado en el LBD como una modificación inactivante presente en células intercaladas del túbulo colector renal en respuesta a una disminución de los niveles de angiotensina II y aumento del K^+ circulante. Shibata et al. sugieren que la inactivación de MR fosforilado en S843 se debe exclusivamente al defecto en la unión de MR y aldosterona. De acuerdo a sus experimentos usando un mutante fosfomimético (MR-S843E), la afinidad por el ligando disminuye dos órdenes de magnitud (la Kd del mutante S843E respecto al MR nativo aumenta de 0,63 nM a 86 nM), no observándose traslocación a la concentración fisiológica de aldosterona de 1 nM. Sin embargo, no queda claro si el receptor fosforilado puede ser activado por concentraciones mayores de aldosterona. En este trabajo se pretende dar respuesta a dos preguntas relacionadas con el mecanismo de regulación de MR por fosforilación del residuo S843: 1) cuál es el mecanismo preciso por el que la fosforilación del residuo S843 afecta a la activación de MR por aldosterona; y 2) cómo afectan distintas proporciones de receptor fosforilado y no fosforilado a la función del mismo.

Debido a lo anterior, en este trabajo nos planteamos profundizar sobre las repercusiones de la fosforilación de S843 sobre la biología de MR, explorando la relación entre el cambio estructural inducido por la modificación y la función del receptor (Jimenez-Canino et al., 2016b). Usamos los mutantes fosfomiméticos S839D y S839E (el residuo S839 del MR de ratón es equivalente al residuo S843 del MR humano) para estudiar la localización subcelular, traslocación nuclear inducida por ligando, transactivación de la expresión génica e interacción con coactivadores en la línea celular COS-7. Los resultados indican que la fosforilación de MR en el residuo S839 ejerce un papel dominante negativo sobre los dímeros de MR, de forma que se amplifica su efecto funcional sobre la actividad transcripcional de MR. La aldosterona es capaz de inducir traslocación nuclear de los mutantes fosfomiméticos, pero es incapaz de producir transactivación génica, sugiriendo el desacoplamiento entre la unión de la hormona y la actividad transcripcional del receptor, debido al menos en parte a una menor interacción de los mutantes fosfomiméticos con coactivadores transcripcionales.

Con el fin de asegurar que los mutantes fosfomiméticos MR-S839D y MR-S839E muestran afinidades por aldosterona comparables a la construcción de MR humana

72

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

88 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

usada por Shibata et al., calculamos la Kd mediante ensayos de competición con radioligando. Obtuvimos una Kd para la construcción control de MR de 1,07 nM, dentro del rango esperado para MR nativo (Kd = 0,5 – 2 nM), mientras que los mutantes fosfomiméticos mostraron una Kd de 86,7 nM para MR-S839D y 34,3 nM para MR-S839E (Fig. 1; Jimenez-Canino et al., 2016b), en el mismo rango que la obtenida por Shibata et al. para MR-S843E.

6.3.1 La fosforilación de MR afecta a su cinética de traslocación, pero solo impide parcialmente su acumulación nuclear

Analizamos la localización del receptor en ausencia y presencia de aldosterona. Observamos como en ausencia de hormona MR muestra la típica localización principalmente citosólica en COS-7, mientras que los mutantes fosfomiméticos no producen cambio en su localización (Fig. 2 A y C; Jimenez-Canino et al., 2016b). El tratamiento con dosis crecientes de aldosterona cubriendo el rango fisiológico (0,1 – 2 nM) y supra fisiológico (5 – 100 nM) mostró la traslocación completa del MR nativo, con un porcentaje mayor al 90% de células con MR exclusivamente nuclear a partir de la concentración de 1 nM (Fig. 2 A y C; Jimenez-Canino et al., 2016b). Los mutantes fosfomiméticos sufren una traslocación incompleta que se hace evidente con concentraciones elevadas de aldosterona (10 y 100 nM), donde más del 90% de células muestran un receptor mayoritariamente nuclear (Fig. 2 B y C; Jimenez-Canino et al., 2016b). Los resultados demuestran que si bien la traslocación nuclear de los mutantes fosfomiméticos se ve afectada, lo hace de forma limitada, obteniendo a altas concentraciones de aldosterona una cantidad significativa de receptor en el núcleo. Esto es consistente con la idea de que las mutaciones fosfomiméticas disminuyen la afinidad de MR por aldosterona.

A continuación examinamos la cinética de traslocación del receptor al núcleo *in vivo* durante la primera hora tras la adición de aldosterona a 10 nM, tiempo en el que MR nativo es capaz de traslocar completamente al núcleo (Fig. 3 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016b). El mutante fosfomimético MR-S839D migró al núcleo en cantidad menor al 20% (Fig. 3 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016b). Concluimos que el defecto en el importe nuclear detectado en el experimento anterior se debe a la traslocación lenta de los mutantes fosfomiméticos, y no a la exportación rápida desde el núcleo de los mismos. Este hecho puede ser explicado por la disminución en la afinidad del receptor

73

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

89 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

por el ligando, pero también por una menor estabilidad de la unión de la aldosterona al LBD o bien por el posible desacoplamiento entre la unión de la aldosterona y el cambio conformacional del receptor que inicia el proceso de traslocación. Sin embargo, es interesante resaltar que pese a la lenta traslocación del receptor, la aldosterona es capaz de promover la localización de la mayor parte del mismo al núcleo en un tiempo de 24 horas (Fig. 2, Jimenez-Canino et al., 2016b). Shibata et al. no encontraron traslocación del receptor en presencia de aldosterona, sin embargo, la concentración de 1 nM que utilizaron está lejos de la K_d de 86 nM que calcularon. Así concluyeron que la inactividad del receptor por la fosforilación en S843 se debe al defecto de la unión de aldosterona. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la traslocación no se ve completamente impedida y de hecho alcanza un porcentaje importante del receptor a altas concentraciones de aldosterona. Esto indica que existe unión de la hormona al mutante fosfomimético, además la proporción de receptor presente en el núcleo sigue una relación dosis respuesta con la concentración de aldosterona (Fig. 2 D; Jimenez-Canino et al., 2016b), por lo que el *binding* no puede ser totalmente evitado por la fosforilación del residuo S839 de MR.

6.3.2 La actividad transcripcional de los dímeros de MR fosforilado es interrumpida debido a un defecto en la unión con coactivadores

Para estudiar las consecuencias funcionales de las mutaciones en S839, hemos construido curvas dosis-respuesta de MR para aldosterona o cortisol mediante ensayos de luciferasa cuya expresión está controlada por el promotor GRE2x. Los resultados indican que mientras la afinidad aparente para MR nativo entra dentro de lo esperado (EC_{50} de 0,4 nM para MR por aldosterona y 9,8 nM para MR por cortisol), los mutantes fosfomiméticos no son capaces de provocar ningún tipo de transactivación dependiente de aldosterona ni cortisol, incluso a altas concentraciones de ligando (1 μ M de aldosterona o 10 μ M de cortisol) (Fig. 4 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016b). Esto no es consistente con lo propuesto por Shibata et al., ya que si todo el efecto de las mutaciones fosfomiméticas fuera una disminución de la afinidad ($K_d = 30 - 90$ nM para aldosterona), una concentración muy superior de ligando como por ejemplo 1 μ M de aldosterona debería ser capaz de activar al menos parcialmente al receptor. Hemos testado también la capacidad transactivadora del mutante no fosforilable MR-S839A (Fig. 4 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016b), obteniendo una disminución de la afinidad aparente por aldosterona (EC_{50} de 2,8 nM por aldosterona y 19,3 nM por cortisol),

74

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

90 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

demonstrando la importancia del residuo S839 en la habilidad del ligando para activar el receptor.

Los resultados anteriores sugieren que debe haber un desacoplamiento entre la unión de la aldosterona, que hemos demostrado anteriormente por su efecto sobre la traslocación nuclear, y la actividad transcripcional del receptor fosfomimético, dado que encontramos receptores totalmente inactivos a las mismas concentraciones y tiempos donde la aldosterona es capaz de promover traslocación. Dado que la disminución de la afinidad calculada para los mutantes fosfomiméticos MR-S839D y MR-S839E (Kd de 86,7 nM y 34,3 nM respectivamente) muestra una discrepancia con la EC₅₀ tanto por aldosterona como por cortisol (no se encuentra actividad a concentraciones de ligando 10 veces por encima de la Kd), concluimos un efecto inconsistente con la disminución de la afinidad por el ligando como única explicación al efecto funcional.

Hipotetizamos que los mutantes fosfomiméticos previenen el cambio conformacional necesario que permite, una vez unido el ligando, la activación del receptor mediante la interacción con correguladores, aspecto crítico para la capacidad transactivadora de MR. Para comprobar esta idea estudiamos la interacción de MR y los mutantes fosfomiméticos del receptor con SRC-1. SRC-1 presenta una localización nuclear tanto en ausencia como en presencia de aldosterona, mientras que MR, como hemos visto anteriormente, presenta una localización citosólica en la línea COS-7 y muestra la localización nuclear inducida por la adición de aldosterona (Fig. 5 A; Jimenez-Canino et al., 2016b). Para detectar y cuantificar la interacción de MR y SRC-1 llevamos a cabo un ensayo de PLA, cuantificando la interacción nuclear de ambas proteínas en el núcleo tras la adición de aldosterona 10 nM (Fig. 5 B; Jimenez-Canino et al., 2016b). El análisis de las señales de PLA muestra la drástica reducción en la interacción (aprox. un 85% menor en comparación con el control) de los mutantes fosfomiméticos MR-S839E y MR-S839D con SRC-1 (Fig. 5 C; Jimenez-Canino et al., 2016b), obteniendo así una explicación razonable para el desacoplamiento entre la unión de la aldosterona y la capacidad transactivadora de MR mediante la fosforilación del residuo S839. El cambio conformacional inducido por el ligando debe ser suficiente para que ocurra la traslocación nuclear, pero no para inducir el reclutamiento de coactivadores como SRC-1.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Para profundizar en el impacto funcional de la fosforilación parcial de MR hemos cotransfectado MR-S839D con MR nativo en diferentes proporciones, simulando diferentes proporciones de MR fosforilado sobre los dímeros funcionalmente activos. En primer lugar aseguramos que el mutante fosfomimético no tiene ningún impacto sobre la formación de dímeros de MR mediante PLA, observando la ausencia de cambios en los niveles de dimerización cuando cuantificamos la interacción de dos construcciones nativas de MR y la comparamos con la dimerización de MR nativo con el mutante S839D, en presencia de aldosterona 10 nM (Fig. 6 B y C; J Jimenez-Canino et al., 2016b). El resultado indica que no existe una preferencia en la formación de dímeros de MR nativos sobre la formación de heterodímeros con la presencia del mutante fosfomimético. Esto no es de extrañar puesto que las secuencias importantes en la formación de dímeros se atribuyen al DBD de MR, no al LBD. Por ello, ante las diferentes proporciones de MR nativo y mutante fosfomimético, la formación de homodímeros de MR nativo o mutante fosfomimético y heterodímeros mezcla de ambos, debe seguir una distribución binomial (Tabla 2; Jimenez-Canino et al., 2016b). En segundo lugar, testamos la localización subcelular del receptor en presencia de aldosterona 10 nM para las diferentes proporciones utilizadas, observando como la variación en la distribución del receptor es consistente con el efecto sobre la traslocación nuclear visto anteriormente (Fig. 6 D y Tabla 3; Jimenez-Canino et al., 2016b). Finalmente, llevamos a cabo las curvas dosis-respuesta de las distintas combinaciones de MR nativo y mutante, observando como la capacidad transactivadora del receptor en las distintas condiciones se corresponde con las cantidades de homodímeros de MR nativo predichas según la distribución binomial (Fig. 7 y Tabla 2; Jimenez-Canino et al., 2016b). Estos resultados demuestran un efecto dominante negativo de la fosforilación del residuo S839 sobre la actividad de MR. Esto es, la presencia de una sola subunidad del dímero fosforilada es suficiente para prevenir totalmente la actividad del receptor. Los resultados sugieren que ambas unidades del dímero de MR deben adoptar una conformación productiva para el reclutamiento de coactivadores. En el caso de existir reclutamiento del coactivador SRC-1 por parte de un solo monómero del dímero no sería suficiente para promover la transactivación génica. Una importante consecuencia fisiológica de este hecho es que en el rango fisiológico de los niveles de aldosterona circulante, la fosforilación de S839 tiene un potente efecto de inactivación del receptor, ya que por ejemplo un 50% del receptor fosforilado mostraría

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

una total inactividad transcripcional, según se puede apreciar en la Fig. 7 (Jimenez-Canino et al., 2016b).

Dada la posibilidad de heterodimerización de MR con GR (Farman et al., 2001), testamos si la fosforilación de MR-S839 tiene algún efecto funcional sobre la actividad de dichos dímeros en presencia de cortisol. Las curvas dosis respuesta muestran como la coexpresión de MR y GR en la misma proporción da lugar a una disminución de la capacidad transactivadora del dímero de aprox. el 50% en comparación con la actividad de los homodímeros de GR (Fig. 8 A; Jimenez-Canino et al., 2016b), consistente con datos previamente publicados (Liu et al., 1995). Con la coexpresión de GR con MR-S839D la disminución de la actividad se acentúa hasta el 75%, una disminución igual a la observada para la formación de los heterodímeros de MR nativo y MR-S839D en presencia de aldosterona (Fig. 8 A y B; Jimenez-Canino et al., 2016b). Estos resultados sugieren que los heterodímeros de MR y GR tienen muy baja o nula capacidad transactivadora, estando la mayoría de la actividad controlada por la formación de homodímeros de MR o de GR. Dado que la fosforilación inactiva a MR de forma dominante negativa, la fosforilación de MR en este residuo sería capaz de disminuir acusadamente la transactivación mediada por cortisol en células que coexpresan MR y GR.

6.3.3 Impacto estructural de la fosforilación sobre el LBD de MR

Dado que el LBD de MR ha sido cristalizado y su estructura publicada (PDB: 3VHU; Hasui et al., 2011), realizamos en colaboración con el Dr. Miguel X. Fernandes (Universidad de La Laguna) un análisis estructural para modelar el impacto de la fosforilación S843 y compararlo con el mutante fosfomimético S839D. La simulación informática muestra como la fosforilación del residuo S843 provoca un cambio conformacional en las hélices H6 y H7, muy cerca del sitio de unión a la hormona, que podría provocar defectos en la unión del ligando (Fig. 8; datos no publicados).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

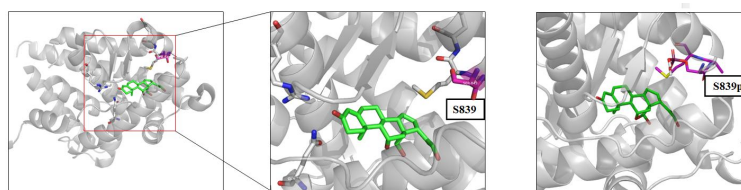


Figura 8: Estructura del LBD de MR con aldosterona unida. Se muestran los residuos probablemente importantes (izquierda). Detalle del sitio de unión al ligando y situación del residuo S839 (centro). Simulación de la fosforilación de S839 y su impacto en la conformación del sitio de unión (derecha).

Llevamos a cabo el cálculo mediante *docking* molecular de las energías de interacción de la aldosterona, cortisol y espironolactona con el LBD de MR en su forma nativa, con las mutaciones fosfomiméticas S843D o S843E y la fosforilación de S843. Esta técnica tiene como objetivo identificar las posiciones correctas del ligando en el centro activo de la proteína y predecir la afinidad entre ligando y proteína. El *docking* se basa en dos principios, la complementariedad de las formas y la complementariedad química, para predecir la interacción entre ligando y proteína. Las energías de interacción por aldosterona o cortisol muestran sólo un leve desvío por las modificaciones introducidas, sugiriendo que la reducción de la afinidad encontrada para los mutantes fosfomiméticos debe tener una causa cinética, estando alterada la velocidad de entrada o salida de la hormona en el centro activo en mayor medida que el cambio sobre el estado de equilibrio (Tabla 1; Jimenez-Canino et al., 2016b). Si bien no se puede excluir una mayor dificultad en el acceso del ligando al sitio de unión, esta posibilidad es poco probable, dado que en el modelo estructural (Fig. 8) la apertura del centro activo del LBD no parece estar alterada. Es interesante notar que la energía de interacción de la estructura fosforilada con todos los ligandos estudiados se asemeja en mayor medida con la del mutante S843D que con la de S843E, lo que sugiere que el uso de S843D constituye en este caso una mejor aproximación para el estudio de la fosforilación de este residuo.

Por último, realizamos un estudio de los modos normales de vibración del LBD de MR para obtener una simulación molecular dinámica, relacionada con la capacidad de la aldosterona para estabilizar la estructura del LBD de MR nativo, el mutante MR-S843D

78

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

94 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

o el MR fosforilado en S843. En este tipo de análisis se estudian los movimientos colectivos y de gran amplitud de los átomos alrededor de una conformación proteica con energía potencial mínima. Este análisis se basa en el supuesto de que los movimientos globales de las proteínas no dependen mucho de las fuerzas que se aplican sobre cada átomo en particular y pueden ser calculados utilizando modelos mecánicos simplificados. Los resultados nos muestran como, una vez más, el mutante fosfomimético se comporta igual al modelo fosforilado (Fig. 9; datos no publicados), sugiriéndolo como una buena aproximación para el estudio de esta modificación. A su vez, la amplitud vibracional del LBD en presencia de las modificaciones sugiere una mayor dificultad para estabilizar la estructura de esta zona de la proteína, lo cual podría estar relacionado con la parcialmente impedida traslocación nuclear y/o el desacoplamiento entre la unión del ligando y la estabilidad de una conformación apropiada para el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como SRC-1.

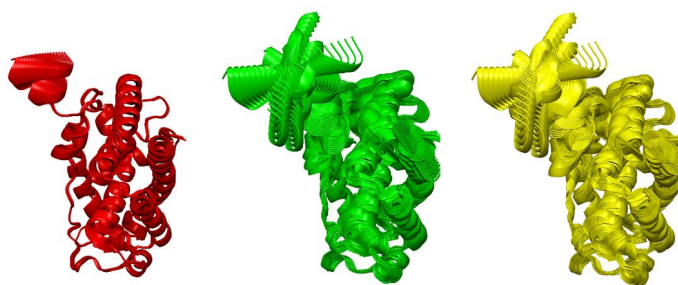


Figura 9: Modos vibracionales para MR nativo (izquierda), MR-S839D (centro) y MR-S839p (derecha).

Profundizando en el modo vibracional más probable observamos que la región que presenta una mayor flexibilidad en la estructura del LBD cuando se introducen las modificaciones se trata de la región que forma el lazo entre las hélices H3 y H4 (Fig. 10; datos no publicados). Dado que este área forma, junto a la hélice H12, la superficie de interacción con coactivadores, denominada región de activación de la transcripción-2 (AF-2; Moras et al., 1998), es posible que una flexibilidad aumentada dificulte su función. Los resultados sugieren esta región como la base del cambio conformacional que explica el pobre reclutamiento de coactivadores como SRC-1, que se unen a la región AF-2, ante la fosforilación de MR en el residuo en cuestión.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

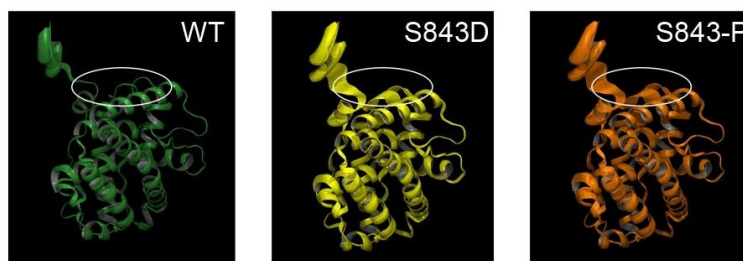


Figura 10: Primer modo vibracional para MR nativo (izquierda), MR-S839D (centro) y MR-S839p (derecha). El círculo blanco resalta la región que une las hélices H3 y H4 del LBD.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

6.4 Mecanismo de acción del diurético Torasemida

La acción excesiva de MR durante la evolución de las enfermedades cardiovasculares resulta perjudicial, como demuestra el efecto beneficioso de la utilización de antagonistas de MR en pacientes con insuficiencia cardíaca. Por otra parte, el uso de diuréticos, particularmente diuréticos de asa como la torasemida, muestra una mejora en la morbilidad y mortalidad por patologías cardiovasculares mediante diferentes mecanismos. Se ha sugerido que la torasemida, a diferencia de otros diuréticos de asa como la furosemida, podría producir un efecto beneficioso combinado sumando a su carácter diurético el de antagonista de MR (Uchida et al., 1992). Sin embargo, esta sugerencia se basa en observaciones indirectas, sin que se haya comprobado si la torasemida es de hecho un antagonista de MR. Por ello, en este trabajo realizado en colaboración con el grupo del Dr. Frederic Jaisser (*Centre de Recherche des Cordeliers*, París), evaluamos la acción de la torasemida en cardiomiocitos para dilucidar si actúa como un agente bloqueante de MR, comparando sus efectos con un antagonista clásico de MR como la espironolactona (Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013). Analizamos la traslocación nuclear de MR en la línea celular COS-7 en presencia o ausencia de los fármacos y la actividad transcripcional en la línea celular H9C2, utilizando ensayos con un gen reportero y evaluando la expresión de genes endógenos relacionados con el daño cardíaco inducido por aldosterona. Los resultados muestran cómo, a diferencia de la espironolactona, la torasemida no modifica la traslocación nuclear de MR, no es capaz de reducir la transactivación inducida por aldosterona y no bloquea la inducción de los genes endógenos ensayados. Estos resultados demuestran que la torasemida no actúa como un antagonista de MR, indicando que los efectos beneficiosos de este fármaco para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca son debidos a otras vías complementarias, muy probablemente relacionadas con su potente actividad como diurético.

6.4.1 La torasemida es incapaz de promover la traslocación nuclear de MR y no afecta a la traslocación inducida por aldosterona

En primer lugar analizamos la cinética de traslocación de MR inducida por aldosterona en COS-7. Los resultados muestran como la traslocación completa de MR en presencia de 10 nM aldosterona en un tiempo inferior a 1 hora se ve afectada significativamente por la presencia del antagonista de MR espironolactona 1 μ M. Por el contrario, la traslocación del receptor mediada por la aldosterona no se altera en presencia del

81

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

97 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

diurético torasemida 1 μM (Fig. 1; Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013). Es de interés observar como la espironolactona, a pesar de su efecto antagonista de la función del receptor, es capaz de promover la traslocación del mismo, aunque a velocidad muy lenta. Este hecho es consistente con observaciones anteriores (Fejes Toth et al., 1998), mientras que de nuevo en contraste, la torasemida no media traslocación del receptor (Fig. 1; Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013).

Estos resultados ponen de manifiesto que la torasemida no muestra un comportamiento similar a la espironolactona. Ésta se une a MR provocando cierto cambio conformacional que le permite trasladar al núcleo, si bien el efecto inhibitorio de la espironolactona no se ha relacionado con la competencia con aldosterona sino con la adopción de una conformación ineficiente para el reclutamiento de coactivadores (Farman et al. 2001). El hecho de que la torasemida no provoque la traslocación del receptor no significa que no se una al receptor. Sin embargo, el hecho de que no influya en la cinética de traslocación mediada por aldosterona demuestra que no compite con la aldosterona por el mismo sitio de unión, por lo que el posible mecanismo de acción antagonista de MR tendría que ser alostérico y no competitivo.

6.4.2 La torasemida no bloquea la actividad transcripcional de MR sobre genes reporteros

Los ensayos con el gen reportero de la luciferasa para cuantificar la transactivación de MR fueron llevados a cabo en la línea celular H9C2, una línea con bajos niveles de expresión de MR (Fejes-Toth et al., 2007). Observamos como MR fue activado por aldosterona (10 nM), induciendo la transcripción de la luciferasa. Esta actividad fue antagonizada por el tratamiento simultáneo con espironolactona (1 μM), mientras que un antagonista de GR como el RU38486 (1 μM) no tuvo efecto sobre la transactivación de luciferasa mediada por aldosterona. Así mismo, observamos como los antagonistas por sí solos no presentan ningún efecto (Fig. 2 B; Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013). Estos resultados demuestran la activación específica de MR por aldosterona en este contexto celular. A continuación se realizó un experimento de activación de MR con aldosterona (10 nM) y en presencia de concentraciones crecientes de espironolactona o torasemida (10 nM - 1 μM), para comparar la capacidad inhibitoria de ambos sobre la transactivación de luciferasa inducida por aldosterona. Se observa como la espironolactona tiene un efecto de inhibición dependiente de la concentración,

82

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

98 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

consistente con el efecto competidor sobre el LBD de MR, llegando a inhibir completamente la capacidad transactivadora de la aldosterona cuando se añade una concentración 100 veces superior del antagonista. Por otra parte, la torasemida tiene un leve efecto inhibitor independiente de la concentración añadida (Fig. 2 C; Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013). Para estudiar el potencial efecto inhibitor de la torasemida se llevó a cabo el experimento utilizando una concentración inferior de aldosterona (1 nM, dentro del rango fisiológico del mineralocorticoide) encontrando que no existe ningún efecto inhibitor de la acción de la aldosterona, incluso con una concentración 1000 veces superior de torasemida (Fig. S1; Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013).

6.4.3 La torasemida no tiene efecto antagonista sobre la expresión génica endógena inducida por aldosterona

Para estudiar el posible efector inhibitor de MR de la torasemida en un contexto fisiológico, analizamos la capacidad de la aldosterona de inducir la expresión de genes considerados diana de MR en cardiomiocitos, utilizando para ello la línea celular H9C2. Mediante qPCR, testamos los efectos de la espironolactona en comparación con la torasemida, en la inhibición del efecto de MR/aldosterona sobre la expresión de los genes SGK-1 (kinasa inducible por suero y glucocorticoides), Orosomucoide-1, Serpina-3, PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno), RGS-2 (regulador de la señalización por proteína G) y Tenascina-X. La torasemida por sí sola fue capaz de disminuir significativamente la expresión basal de Orosomucoide-1 y Tenascina-X, que tienen una débil expresión en cardiomiocitos en ausencia de aldosterona (Fig. S2; Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013). En presencia de aldosterona 10 nM y concentraciones crecientes de espironolactona o torasemida (10 nM - 1 µM), la actividad antagonista mostrada por la espironolactona no se observa en ningún caso con la torasemida, incluso a altas concentraciones del diurético (Fig. 3; Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013).

Una vez más, testamos el potencial papel antagonista de la torasemida utilizando una concentración inferior de aldosterona (1 nM) para situarnos en un rango fisiológico, encontrando que tampoco existe en este caso efecto inhibitor de la torasemida incluso aumentando su concentración 1000 veces por encima de la concentración de aldosterona, en contraste con el claro efecto de la espironolactona (Fig. 4; Gravez,

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Jimenez-Canino et al., 2013). También se estudió la posibilidad de que la torasemida tuviera un efecto potenciador del antagonismo mostrado por la espirolactona, seleccionando una dosis de espirolactona lo suficientemente baja (10 nM) para no llegar a producir un efecto significativo de disminución de la expresión de tres de los anteriores genes en presencia de aldosterona 10 nM. Los resultados muestran como en ningún caso la torasemida (1 µM) tuvo el efecto de sensibilizar a MR respecto a la acción de la espirolactona (Fig. S2; Gravez, Jimenez-Canino et al., 2013).

En conclusión, los datos aportados en el presente trabajo no son consistentes con un efecto antagonista de la torasemida, ya sea competitivo o alostérico. Las distintas aproximaciones para compararla con la espirolactona, un conocido antagonista de MR, no son compatibles con la actividad antagonista sugerida en publicaciones previas, donde altas dosis de torasemida fueron capaces de inhibir la unión de la aldosterona a MR en una fracción citoplasmática de homogeneizados de riñón de rata (Uchida et al., 1992). Estos resultados podrían explicarse mediante un efecto tejido-específico de la torasemida, si bien este fenómeno no ha sido descrito nunca con antagonistas de MR ni queda claro el mecanismo a través del cual podría generarse este efecto. En el futuro sería interesante esclarecer si los efectos beneficiosos de la torasemida sobre el daño cardíaco, presumiblemente mediante mecanismos que previenen el desarrollo de fibrosis, podrían ser complementarios al uso conjunto de antagonistas de MR, que actúa sobre distintas vías.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

CONCLUSIONES

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

101 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

101 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

7. CONCLUSIONES

- La acetilación de HSP90 en la lisina 295 provoca alteraciones en la dinámica subcelular de MR, así como en su traslocación nuclear. A diferencia de GR, esta modificación no provoca cambios en la actividad transcripcional del receptor. Los resultados sugieren que la acetilación de HSP90 podría modular la actividad relativa de MR y GR en células que expresan ambos receptores.
- HSD2 está SUMOilada en el residuo K266. Esta modificación altera levemente las características cinéticas de la enzima, pero tiene una gran importancia en el control de la localización subcelular de MR y de su actividad en presencia del ligando cortisol.
- La fosforilación de MR en la serina 839, además de disminuir la afinidad por aldosterona, desacopla la unión del ligando con la activación del receptor, interrumpiendo la interacción con coactivadores transcripcionales. Esta modificación provoca la inactivación de los dímeros del receptor de forma dominante negativa, lo que amplifica el efecto funcional de la fosforilación.
- El mecanismo de acción del diurético torasemida como fármaco cardioprotector no tiene lugar mediante el bloqueo de la unión de MR a aldosterona, ni previene la activación del receptor por dicha hormona.

87

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

103 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

CONCLUSIONS

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

105 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

105 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

8. CONCLUSIONS

- HSP90 acetylation in lysine 295 alters MR subcellular dynamics and nuclear translocation. In contrast to GR, it does not cause changes in receptor transcriptional activity. These results suggest that HSP90 acetylation may play a role in balancing relative MR and GR activity when both factors are co-expressed in the same cell.
- HSD2 is SUMOylated at residue K266. This modification slightly alters kinetic features of the enzyme but presents a large importance in the control of MR subcellular localization and activity in presence of the ligand cortisol.
- MR phosphorylation in serine 839 decreases affinity by aldosterone. In addition, it uncouples ligand binding with receptor activation disrupting interaction with transcriptional co-activators. Phosphorylation promotes inactivation of receptor dimers in a dominant negative manner, effectively amplifying its functional effect.
- The mechanism of action of the loop diuretic torasemide as a cardioprotective drug does not occur by blocking aldosterone binding to MR and does not prevent receptor activation by this hormone.

91

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

107 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

107 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

BIBLIOGRAFÍA

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

109 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

109 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Sanchez, C., Hernandez-Diaz, I., Lorenzo-Diaz, F., Navarro, J. F., Hughes, T. E., Giraldez, T., et al. (2012). Identification of permissive insertion sites for generating functional fluorescent mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*, 153(7), 3517-3525.
- Ai, J., Wang, Y., Dar, J. A., Liu, J., Liu, L., Nelson, J. B., et al. (2009). HDAC6 regulates androgen receptor hypersensitivity and nuclear localization via modulating Hsp90 acetylation in castration-resistant prostate cancer. *Molecular Endocrinology*, 23(12), 1963-1972.
- Alnemri, E. S., Maksymowych, A. B., Robertson, N. M., & Litwack, G. (1991). Overexpression and characterization of the human mineralocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(27), 18072-18081.
- Alvarez de la Rosa, D., Zhang, P., Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G., & Canessa, C. M. (1999). The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of xenopus oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 37834-37839.
- Alvarez de la Rosa, D., Canessa, C. M., Fyfe, G. K., & Zhang, P. (2000). Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annual Review of Physiology*, 62, 573-594.
- Alvarez de la Rosa, D., Navarro, J.F., Giraldez, T. (2013). ENaC modulators and renal disease. *Current Molecular Pharmacology*, 6, 35-43.
- Armani, A., Marzolla, V., Fabbri, A., & Caprio, M. (2015). Cellular mechanisms of MR regulation of adipose tissue physiology and pathophysiology. *Journal of Molecular Endocrinology*, 55(2), R1-10.
- Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E., et al. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary

95

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

111 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- DNA: Structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4812), 268-275.
- Atlas, S. A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy : JMCP*, 13(8 Suppl B), 9-20.
- Binart, N., Lombes, M., & Baulieu, E. E. (1995). Distinct functions of the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: Effects of hsp90 deletion mutants. *The Biochemical Journal*, 311(Pt 3), 797-804.
- Black, B. E., Holaska, J. M., Rastinejad, F., & Paschal, B. M. (2001). DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Current Biology : CB*, 11(22), 1749-1758.
- Bramlage, P., Swift, S. L., Thoenes, M., Minguet, J., Ferrero, C., & Schmieder, R. E. (2016). Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonism for the treatment of cardiovascular and renal disease. *European Journal of Heart Failure*, 18(1), 28-37.
- Buggey, J., Mentz, R. J., Pitt, B., Eisenstein, E. L., Anstrom, K. J., Velazquez, E. J., et al. (2015). A reappraisal of loop diuretic choice in heart failure patients. *American Heart Journal*, 169(3), 323-333.
- Burt, V. L., Whelton, P., Roccella, E. J., Brown, C., Cutler, J. A., Higgins, M., et al. (1995). Prevalence of hypertension in the US adult population. results from the third national health and nutrition examination survey, 1988-1991. *Hypertension*, 25(3), 305-313.
- Cabrero, J. R., Serrador, J. M., Barreiro, O., Mittelbrunn, M., Naranjo-Suarez, S., Martin-Cofreces, N., et al. (2006). Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Molecular Biology of the Cell*, 17(8), 3435-3445.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- Chapman, K., Holmes, M., & Seckl, J. (2013). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: Intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiological Reviews*, 93(3), 1139-1206.
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr, Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., et al. (1998). HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 2979-2984.
- Fagart, J., Wurtz, J. M., Souque, A., Hellal-Levy, C., Moras, D., & Rafestin-Oblin, M. E. (1998). Antagonism in the human mineralocorticoid receptor. *The EMBO Journal*, 17(12), 3317-3325.
- Faresse, N., Ruffieux-Daidie, D., Salamin, M., Gomez-Sanchez, C. E., & Staub, O. (2010). Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 299(6), F1462-72.
- Faresse, N. (2014). Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 334-342.
- Farman, N., & Rafestin-Oblin, M. E. (2001). Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 280(2), F181-92.
- Fejes-Toth, G., Pearce, D., & Naray-Fejes-Toth, A. (1998). Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: Effects of receptor agonists and antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 2973-2978.
- Fejes-Toth, G., & Naray-Fejes-Toth, A. (2007). Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: Clues to cardiac remodeling? *Endocrinology*, 148(4), 1502-1510.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- Ferrari, P., Obeyesekere, V. R., Li, K., Andrews, R. K., & Krozowski, Z. S. (1996). The 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme: Biochemical consequences of the congenital R337C mutation. *Steroids*, 61(4), 197-200.
- Ferrari, P. (2010). The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1802(12), 1178-1187.
- Fuller, P. J., & Young, M. J. (2005). Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension*, 46(6), 1227-1235.
- Funder, J. W., Pearce, P. T., Smith, R., & Smith, A. I. (1988). Mineralocorticoid action: Target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, 242(4878), 583-585.
- Funder, J. W. (2000). Aldosterone and mineralocorticoid receptors: Orphan questions. *Kidney International*, 57(4), 1358-1363.
- Funder, J. W. (2011). Medicine. the genetics of primary aldosteronism. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6018), 685-686.
- Galigniana, M. D., Erlejman, A. G., Monte, M., Gomez-Sanchez, C., & Piwien-Pilipuk, G. (2010). The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Molecular and Cellular Biology*, 30(5), 1285-1298.
- Gallo, L. I., Ghini, A. A., Piwien Pilipuk, G., & Galigniana, M. D. (2007). Differential recruitment of tetratricorpeptide repeat domain immunophilins to the mineralocorticoid receptor influences both heat-shock protein 90-dependent retrotransport and hormone-dependent transcriptional activity. *Biochemistry*, 46(49), 14044-14057.
- Geller, D. S., Rodriguez-Soriano, J., Vallo Boado, A., Schifter, S., Bayer, M., Chang, S. S., et al. (1998). Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. *Nature Genetics*, 19(3), 279-281.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Bibliografía

- Giraldez, T., Rojas, P., Jou, J., Flores, C., & Alvarez de la Rosa, D. (2012). Invited review- the epithelial sodium channel delta subunit: New notes for an old song. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 10.1152/ajprenal.00116.2012
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23(1), 175-182.
- Gomez-Sanchez, C. E., de Rodriguez, A. F., Romero, D. G., Estess, J., Warden, M. P., Gomez-Sanchez, M. T., et al. (2006). Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology*, 147(3), 1343-1348.
- Gouilleux, F., Sola, B., Couette, B., & Richard-Foy, H. (1991). Cooperation between structural elements in hormono-regulated transcription from the mouse mammary tumor virus promoter. *Nucleic Acids Research*, 19(7), 1563-1569.
- Gravez, B., Tarjus, A., Jimenez-Canino, R., El Moghrabi, S., Messaoudi, S., Alvarez de la Rosa, D., & Jaisser, F. (2013). The diuretic torasemide does not prevent aldosterone-mediated mineralocorticoid receptor activation in cardiomyocytes. *PloS One*, 8(9), e73737.
- Griekspoor, A., Zwart, W., Neefjes, J., & Michalides, R. (2007). Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nuclear Receptor Signaling*, 5, e003.
- Harvey, B. J., Alzamora, R., Stubbs, A. K., Irnaten, M., McEneaney, V., & Thomas, W. (2008). Rapid responses to aldosterone in the kidney and colon. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108(3-5), 310-317.
- Hasui, T., Ohra, T., Ohyabu, N., Asano, K., Matsui, H., Mizukami, A., et al. (2013). Design, synthesis, and structure-activity relationships of dihydrofuran-2-one and dihydropyrrrol-2-one derivatives as novel benzoxazin-3-one-based mineralocorticoid receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(19), 5983-5994.

99

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

115 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

115 / 212

- Hellal-Levy, C., Couette, B., Fagart, J., Souque, A., Gomez-Sanchez, C., & Rafestin-Oblin, M. (1999). Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS Letters*, 464(1-2), 9-13.
- Hernandez-Diaz, I., Giraldez, T., Arnau, M. R., Smits, V. A., Jaisser, F., Farman, N., et al. (2010). The mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive nuclear localization signals. *Endocrinology*, 151(8), 3888-3899.
- Hernandez-Diaz, I., Giraldez, T., Morales, S., Hernandez, G., Salido, E., Canessa, C. M., et al. (2013). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 is a tissue-specific aldosterone target gene with prominent induction in the rat distal colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304(2), G122-31.
- Hirschberg, D., Jagerbrink, T., Samskog, J., Gustafsson, M., Stahlberg, M., Alvelius, G., et al. (2004). Detection of phosphorylated peptides in proteomic analyses using microfluidic compact disk technology. *Analytical Chemistry*, 76(19), 5864-5871.
- Hoorn, E. J., & Ellison, D. H. (2012). WNK kinases and the kidney. *Experimental Cell Research*, 318(9), 1020-1026.
- Hurley, D. M., Accili, D., Stratakis, C. A., Karl, M., Vamvakopoulos, N., Rorer, E., et al. (1991). Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(2), 680-686.
- Jimenez-Canino, R., Lorenzo-Diaz, F., Jaisser, F., Farman, N., Giraldez, T., & Alvarez de la Rosa, D. (2016a). Histone deacetylase 6-controlled Hsp90 acetylation significantly alters mineralocorticoid receptor subcellular dynamics but not its transcriptional activity. *Endocrinology* 157(6), 2515-32.
- Jimenez-Canino, R., Fernandes, M. X., & Alvarez de la Rosa, D. (2016b). Phosphorylation of mineralocorticoid receptor ligand binding domain impairs

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- receptor activation and has a dominant negative effect over non-phosphorylated receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 291(36), 19068-78.
- Kannel, W. B. (2000). Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Cardiology*, 85(2), 251-255.
- Kolkhof, P., & Borden, S. A. (2012). Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: Prospects for novel therapeutics. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(2), 310-317.
- Kovacs, J. J., Murphy, P. J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J. T., Nicchitta, C. V., et al. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular Cell*, 18(5), 601-607.
- Kucher, V., Boiko, N., Pochynyuk, O., & Stockand, J. D. (2011). Voltage-dependent gating underlies loss of ENaC function in pseudohypoaldosteronism type 1. *Biophysical Journal*, 100(8), 1930-1939.
- Kumar, S., Saradhi, M., Chaturvedi, N. K., & Tyagi, R. K. (2006). Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: An overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246(1-2), 147-156.
- Latouche, C., El Moghrabi, S., Messaoudi, S., Nguyen Dinh Cat, A., Hernandez-Diaz, I., Alvarez de la Rosa, D., et al. (2012). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 59(5), 966-972.
- Lee, H. A., Lee, D. Y., Cho, H. M., Kim, S. Y., Iwasaki, Y., & Kim, I. K. (2013). Histone deacetylase inhibition attenuates transcriptional activity of mineralocorticoid receptor through its acetylation and prevents development of hypertension. *Circulation Research*, 112(7), 1004-1012.
- Lifton, R. P. (1996). Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5262), 676-680.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Bibliografía

- Lifton, R. P., Gharavi, A. G., & Geller, D. S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, 104(4), 545-556.
- Liu, W., Wang, J., Sauter, N. K., & Pearce, D. (1995). Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 12480-12484.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408.
- Lombes, M., Kenouch, S., Souque, A., Farman, N., & Rafestin-Oblin, M. E. (1994). The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 135(3), 834-840.
- Manning, J. R., Bailey, M. A., Soares, D. C., Dunbar, D. R., & Mullins, J. J. (2010). In silico structure-function analysis of pathological variation in the HSD11B2 gene sequence. *Physiological Genomics*, 42(3), 319-330.
- Marcelli, M., Stenoién, D. L., Szafran, A. T., Simeoni, S., Agoulnik, I. U., Weigel, N. L., et al. (2006). Quantifying effects of ligands on androgen receptor nuclear translocation, intranuclear dynamics, and solubility. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(4), 770-788.
- Marissal-Arvy, N., Lombes, M., Petterson, J., Moisan, M. P., & Mormede, P. (2004). Gain of function mutation in the mineralocorticoid receptor of the brown norway rat. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39232-39239.
- Messaoudi, S., Gravez, B., Tarjus, A., Pelloux, V., Ouvrard-Pascaud, A., Delcayre, C., et al. (2013). Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension*, 61(2), 361-367.

102

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

118 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- Moras, D., & Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: Structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(3), 384-391.
- Mosterd, A., D'Agostino, R. B., Silbershatz, H., Sytkowski, P. A., Kannel, W. B., Grobbee, D. E., et al. (1999). Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989. *The New England Journal of Medicine*, 340(16), 1221-1227.
- Muller, C., Cluzeaud, F., Pinon, G. M., Rafestin-Oblin, M. E., & Morfin, R. (2004). Dehydroepiandrosterone and its 7-hydroxylated metabolites do not interfere with the transactivation and cellular trafficking of the glucocorticoid receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(5), 469-476.
- Mune, T., Rogerson, F. M., Nikkila, H., Agarwal, A. K., & White, P. C. (1995). Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nature Genetics*, 10(4), 394-399.
- Murphy, P. J., Morishima, Y., Kovacs, J. J., Yao, T. P., & Pratt, W. B. (2005). Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33792-33799.
- Nguyen Dinh Cat, A., Briones, A. M., Callera, G. E., Yogi, A., He, Y., Montezano, A. C., et al. (2011). Adipocyte-derived factors regulate vascular smooth muscle cells through mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 58(3), 479-488.
- Nishi, M., Tanaka, M., Matsuda, K., Sunaguchi, M., & Kawata, M. (2004). Visualization of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor interactions in living cells with GFP-based fluorescence resonance energy transfer. *The Journal of Neuroscience*, 24(21), 4918-4927.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- Nishi, M. (2011). Dynamics of corticosteroid receptors: Lessons from live cell imaging. *Acta Histochemica Et Cytochemica*, 44(1), 1-7.
- Odermatt, A., Arnold, P., & Frey, F. J. (2001). The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28484-28492.
- Pascual-Le Tallec, L., Kirsh, O., Lecomte, M. C., Viengchareun, S., Zennaro, M. C., Dejean, A., et al. (2003). Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: Implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(12), 2529-2542.
- Pascual-Le Tallec, L., & Lombes, M. (2005). The mineralocorticoid receptor: A journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(9), 2211-2221.
- Pippal, J. B., & Fuller, P. J. (2008). Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, 41(6), 405-413.
- Pitt, B., Remme, W., Zannad, F., Neaton, J., Martinez, F., Roniker, B., et al. (2003). Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1309-1321.
- Pitt, B., Zannad, F., Remme, W. J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., et al. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. randomized aldactone evaluation study investigators. *The New England Journal of Medicine*, 341(10), 709-717.
- Popov, V. M., Wang, C., Shirley, L. A., Rosenberg, A., Li, S., Nevalainen, M., et al. (2007). The functional significance of nuclear receptor acetylation. *Steroids*, 72(2), 221-230.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Bibliografía

- Rafestín-Oblin, M. E., Couette, B., Radanyi, C., Lombes, M., & Baulieu, E. E. (1989). Mineralocorticosteroid receptor of the chick intestine. oligomeric structure and transformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(16), 9304-9309.
- Refolio, E., Cavero, S., Marcon, E., Freire, R., & San-Segundo, P. A. (2011). The Ddc2/ATRIP checkpoint protein monitors meiotic recombination intermediates. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 14), 2488-2500.
- Ronzaud, C., Loffing-Cueni, D., Hausel, P., Debonneville, A., Malsure, S. R., Fowler-Jaeger, N., et al. (2013). Renal tubular NEDD4-2 deficiency causes NCC-mediated salt-dependent hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(2), 657-665.
- Rytinki, M. M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jaaskelainen, T., & Palvimo, J. J. (2009). PIAS proteins: Pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(18), 3029-3041.
- Santos, P. C., Krieger, J. E., & Pereira, A. C. (2012). Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: Pharmacogenetic implications. *Journal of Pharmacological Sciences*, 120(2), 77-88.
- Scroggins, B. T., Robzyk, K., Wang, D., Marcu, M. G., Tsutsumi, S., Beebe, K., et al. (2007). An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Molecular Cell*, 25(1), 151-159.
- Seiferth, A., Ruhs, S., Mildenerger, S., Gekle, M., & Grossmann, C. (2012). The phosphatase calcineurin PP2B β mediates part of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *FASEB Journal*, 26(6), 2327-2337.
- Shibata, S., Rinehart, J., Zhang, J., Moeckel, G., Castaneda-Bueno, M., Stiegler, A. L., et al. (2013). Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell Metabolism*, 18(5), 660-671.

105

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

121 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

121 / 212

Bibliografía

- Simpson, S. A., Tait, J. F., Wettstein, A., Neher, R., Von Euw, J., Schindler, O., et al. (1954). Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid. [Konstitution des Aldosterons, des neuen Mineralocorticoids]. *Experientia*, 10(3), 132-133.
- Smith, D. F., & Toft, D. O. (2008). Minireview: The intersection of steroid receptors with molecular chaperones: Observations and questions. *Molecular Endocrinology*, 22(10), 2229-2240.
- Stanton, J. L., Braitman, L. E., Riley, A. M., Jr, Khoo, C. S., & Smith, J. L. (1982). Demographic, dietary, life style, and anthropometric correlates of blood pressure. *Hypertension*, 4(5 Pt 2), III135-42.
- Stewart, P. M., Wallace, A. M., Valentino, R., Burt, D., Shackleton, C. H., & Edwards, C. R. (1987). Mineralocorticoid activity of liquorice: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age. *Lancet*, 2(8563), 821-824.
- Takahashi, Y., Iwase, M., Strunnikov, A. V., & Kikuchi, Y. (2008). Cytoplasmic sumoylation by PIAS-type Siz1-SUMO ligase. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(12), 1738-1744.
- Taliec, L. P., Kirsh, O., Lecomte, M. C., Viengchareun, S., Zennaro, M. C., Dejean, A., et al. (2003). Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: Implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(12), 2529-2542.
- Tirard, M., Jasbinsek, J., Almeida, O. F., & Michaelidis, T. M. (2004). The manifold actions of the protein inhibitor of activated STAT proteins on the transcriptional activity of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in neural cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 32(3), 825-841.
- Tirard, M., Almeida, O. F., Hutzler, P., Melchior, F., & Michaelidis, T. M. (2007). Sumoylation and proteasomal activity determine the transactivation properties of the mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 268(1-2), 20-29.

106

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

122 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

122 / 212

Bibliografía

- Tsugita, M., Iwasaki, Y., Nishiyama, M., Taguchi, T., Shinahara, M., Taniguchi, Y., et al. (2008). Differential regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and -2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells. *Life Sciences*, 83(11-12), 426-432.
- Uchida, T., Kido, H., Yamanaga, K., Okita, M., & Watanabe, M. (1992). A novel loop diuretic, torasemide, inhibits thromboxane A2-induced contraction in the isolated canine coronary artery. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 45(2), 121-124.
- Valenzuela-Fernandez, A., Alvarez, S., Gordon-Alonso, M., Barrero, M., Ursa, A., Cabrero, J. R., et al. (2005). Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5445-5454.
- Valenzuela-Fernandez, A., Cabrero, J. R., Serrador, J. M., & Sanchez-Madrid, F. (2008). HDAC6: A key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends in Cell Biology*, 18(6), 291-297.
- Viengchareun, S., Le Menuet, D., Martinerie, L., Munier, M., Pascual-Le Tallec, L., & Lombes, M. (2007). The mineralocorticoid receptor: Insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nuclear Receptor Signaling*, 5, e012.
- Walther, R. F., Atlas, E., Carrigan, A., Rouleau, Y., Edgecombe, A., Visentin, L., et al. (2005). A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17549-17561.
- White, P. C., Mune, T., & Agarwal, A. K. (1997). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrine Reviews*, 18(1), 135-156.
- White, P. C. (2004). Aldosterone synthase deficiency and related disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217(1-2), 81-87.

107

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

123 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

123 / 212

Bibliografía

- Yang, J., & Young, M. J. (2009). The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *Journal of Molecular Endocrinology*, 43(2), 53-64.
- Yokota, K., Shibata, H., Kobayashi, S., Suda, N., Murai, A., Kurihara, I., et al. (2004). Proteasome-mediated mineralocorticoid receptor degradation attenuates transcriptional response to aldosterone. *Endocrine Research*, 30(4), 611-616.
- Yokota, K., Shibata, H., Kurihara, I., Kobayashi, S., Suda, N., Murai-Takeda, A., et al. (2007). Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(3), 1998-2010.
- Young, W. F., Jr. (2002). Primary aldosteronism: Management issues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 970, 61-76.
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., et al. (2014). GPS-SUMO: A tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W325-30.

108

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

124 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

124 / 212

ANEXO 1: ARTÍCULOS PUBLICADOS

- 1 **Jimenez-Canino, R.**, Lorenzo-Diaz, F., Jaisser, F., Farman, N., Giraldez, T., & Alvarez de la Rosa, D. (2016). Histone Deacetylase 6-Controlled Hsp90 Acetylation Significantly Alters Mineralocorticoid Receptor Subcellular Dynamics But Not its Transcriptional Activity. *Endocrinology*, *Jun*;157(6):2515-32, en20152055.
- 2 **Jimenez-Canino, R.**, Fernandes, M. X., & Alvarez de la Rosa, D. (2016). Phosphorylation of Mineralocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Impairs Receptor Activation and Has a Dominant Negative Effect over Non-phosphorylated Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *Sep* 2;291(36):19068-78, jbcM116718395.
- 3 Gravez, B., Tarjus, A., **Jimenez-Canino, R.**, El Moghrabi, S., Messaoudi, S., Alvarez de la Rosa, D., & Jaisser, F. (2013). The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes. *PLoS One*, *Sep* 9;8(9), e73737.

109

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

125 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

125 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Histone Deacetylase 6–Controlled Hsp90 Acetylation Significantly Alters Mineralocorticoid Receptor Subcellular Dynamics But Not its Transcriptional Activity

Rubén Jiménez-Canino, Fabián Lorenzo-Díaz, Frederic Jaisser, Nicolette Farman, Teresa Giraldez, and Diego Alvarez de la Rosa

Department of Physiology (R.J.-C., F.L.-D., T.G., D.A.d.l.R.), Institute of Biomedical Technologies and Center for Biomedical Research of the Canary Islands, University of La Laguna, Tenerife 38071, Spain; and INSERM UMRS 1138 (N.J., N.F.), Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, Paris 75006, France

The mineralocorticoid receptor (MR) is a member of the nuclear receptor superfamily that transduces the biological effects of corticosteroids. Its best-characterized role is to enhance transepithelial sodium reabsorption in response to increased aldosterone levels. In addition, MR participates in other aldosterone- or glucocorticoid-controlled processes such as cardiovascular homeostasis, adipocyte differentiation or neurogenesis, and regulation of neuronal activity in the hippocampus. Like other steroid receptors, MR forms cytosolic heterocomplexes with heat shock protein (Hsp) 90, Hsp70, and other proteins such as immunophilins. Interaction with Hsp90 is thought to maintain MR in a ligand-binding competent conformation and to regulate ligand-dependent and -independent nucleocytoplasmic shuttling. It has previously been shown that acetylation of residue K295 in Hsp90 regulates its interaction with the androgen receptor and glucocorticoid receptor (GR). In this work we hypothesized that Hsp90 acetylation provides a regulatory step to modulate MR cellular dynamics and activity. We used Hsp90 acetylation mimic mutant K295Q or nonacetylatable mutant K295R to examine whether MR nucleocytoplasmic shuttling and gene transactivation are affected. Furthermore, we manipulated endogenous Hsp90 acetylation levels by controlling expression or activity of histone deacetylase 6 (HDAC6), the enzyme responsible for deacetylation of Hsp90-K295. Our data demonstrates that HDAC6-mediated Hsp90 acetylation regulates MR cellular dynamics but it does not alter its function. This stands in contrast with the down-regulation of GR by HDAC6, suggesting that Hsp90 acetylation may play a role in balancing relative MR and GR activity when both factors are co-expressed in the same cell. (*Endocrinology* 157: 2515–2532, 2016)

The mineralocorticoid receptor (MR) is a member of the nuclear receptor superfamily of transcription factors displaying high affinity for corticosteroids such as aldosterone and cortisol (1). In tight epithelia, including the distal kidney tubule, the collecting duct, or the distal colon, aldosterone selectively activates MR, which in turn mediates a transcriptional response enhancing transepithelial Na^+ reabsorption, and K^+ and H^+ excretion (2). Loss-of-function or gain-of-function mutations in MR or

its epithelial downstream effectors result in the loss of extracellular volume and mineral homeostasis, leading to disturbances in blood pressure (BP) control (3–5). MR is also expressed outside tight epithelia (1, 6, 7), leading to the notion that this receptor could have pleotropic effects

Abbreviations: AR, androgen receptor; BP, blood pressure; CFP, cyan fluorescent protein; CMV, cytomegalovirus; F_0 , initial nuclear fluorescence; F_{max} , maximal nuclear fluorescence reached; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescent protein; GR, glucocorticoid receptor; HDAC, histone deacetylase; HRE, hormone responsive element; HSD2, 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 2; Hsp90, heat shock protein; MR, mineralocorticoid receptor; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PLA, proximity ligation assay; SGK1, serum and glucocorticoid-induced kinase 1; $t_{1/2}$, time (min) at which fluorescence is halfway between F_0 and F_{max} ; TSA, trichostatin-A; V_{in} , factor determining how steeply nuclear accumulation changes with time; VSMC, vascular smooth muscle cell; WT, wild type; YFP, yellow fluorescent protein.

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in USA
Copyright © 2016 by the Endocrine Society
Received December 14, 2015. Accepted April 13, 2016.
First Published Online April 21, 2016

doi: 10.1210/en.2015-2055

Endocrinology, June 2016, 157(6):2515–2532 press.endocrine.org/journal/endo 2515

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

127 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

both in physiological and pathological settings (8). It is now well established that among other multiple functions, MR affects vascular smooth muscle and endothelial pathophysiology (9), participates in differentiation and function of adipocytes and the epidermal barrier (10, 11), mediates aldosterone/NaCl-induced cardiovascular damage (12), modulates central control of salt appetite and BP (13), and is involved in regulating neurogenesis and neuronal activity in the hippocampus (14).

It is generally accepted that most pathophysiological effects of MR are ligand dependent, resulting from its activation by aldosterone or glucocorticoids. Naïve (unliganded) MR is normally found distributed homogeneously between the cytosol and the nucleus, although cell type-specific differences in subcellular distribution have been reported (15). Upon ligand binding, MR shifts to the nucleus where it interacts with coregulators to modulate the expression of specific genes. MR nucleocytoplasmic shuttling and the maintenance of a competent conformation for ligand binding depend on the formation of heterocomplexes with other cytosolic factors, such as heat shock protein (Hsp) 90, Hsp70, and immunophilins (16). Hsp90 has been previously shown to be essential to maintain MR in a competent ligand-binding conformation and to influence MR subcellular dynamic (17). Changes in the amount of cellular Hsp90 shift the equilibrium between cytosolic and nuclear-located naïve MR (15). In addition, it has recently been recognized that Hsp90 continues to form a complex with MR after ligand binding (18, 19), playing an important role in the process that turns the receptor into competent form for modulating gene expression (18, 19). Therefore, any process controlling Hsp90 expression or activity, including post-translational modifications could be essential in modulating MR function. These include phosphorylation, acetylation, S-nitrosylation, oxidation, and ubiquitination (20). Among them, acetylation has been shown to be an important regulatory modification of Hsp90 activity (21). The main regulatory acetylation site in Hsp90 has been mapped to residue K294 in *H. sapiens* Hsp90 α (22). An acetylation-mimicking mutation in K294 reproduces many but not all of the characteristics of hyperacetylated Hsp90. It impairs interaction with cochaperones and client proteins, but it does not disrupt ATP binding (22). Treatment of cells with histone deacetylase (HDAC) [also known as lysine deacetylases, KDACs (23)] inhibitors induces hyperacetylation of Hsp90, impairing its chaperone and ATP-binding activities (24, 25). The acetyltransferase responsible for Hsp90 acetylation is currently unknown, but a prominent role for HDAC6 in the deacetylation of Hsp90 is well established both in cultured cells (24, 26) and in mice (27).

HDAC6-modulated Hsp90 acetylation has been shown to regulate androgen receptor (AR) activity (28, 29). Glucocorticoid receptor (GR) is also modulated by HDAC6-mediated Hsp90 deacetylation in cultured cells (26, 30). In addition, embryonic fibroblasts derived from HDAC6 knockout mice show impaired dexamethasone-induced GR activation (65% lower transactivation of a reporter gene) and correlates with lower nuclear translocation (27). Furthermore, a physiological implication of HDAC6-modulated hsp90 acetylation on GR function has been found in serotonin neurons (31).

Based on these findings we hypothesized that Hsp90 acetylation at residue K294 (K295 in the mouse ortholog protein) is involved in regulating MR subcellular dynamics and transactivation function. To test this hypothesis we examined the effect of Hsp90 acetylation-mimic mutant K295Q or nonacetylatable mutant K295R on MR subcellular localization, ligand-dependent nuclear translocation, and transactivation function in cell models with different endogenous levels of Hsp90 expression. We also tested the effects of modifying endogenous Hsp90 acetylation levels by controlling HDAC6 expression or activity.

Materials and Methods

Plasmid constructs

A functional fluorescent MR with insertion of yellow fluorescent protein (YFP) after amino acid 147 (MR-147-YFP) was generated as previously described using a random transposon-insertion procedure (32). To generate a derivative of this construct with green fluorescent protein (GFP) (MR-147-GFP), YFP was removed from MR taking advantage of *AscI* flanking sites introduced during the transposition process and the GFP coding sequence was introduced using the same restriction site. The same procedure was used to generate MR with an insertion of three copies of the HA epitope (MR-147-HA). An NH₂-terminal fusion between GR and GFP (GFP-GR) has been described previously (33). *Mus musculus* Hsp90 α cDNA (Ref.: NP_034610.1) was obtained from the IMAGE Consortium (Geneservice) and subcloned in pCFP-N1 vector (Clontech) to produce an in-frame fusion with the cyan fluorescent protein (CFP). Hsp90 acetylation-mimicking and nonacetylatable mutants at a key regulatory lysine [K295, equivalent to K294 in *H. sapiens*; (22)] were introduced by site-directed mutagenesis using the Quickchange Lightning Kit (Agilent Technologies). Mutations were confirmed by DNA sequencing. Plasmid constructs for the expression of wild type (WT) or catalytically inactive mutant HDAC6 (H216A/H611A) fused to GFP or HA epitopes were the kind gift of Dr Agustín Valenzuela-Fernández (University of La Laguna, Laguna, Spain) and have been previously described (34). Knockdown of HDAC6 was achieved using commercially available specific siRNA (Mission esiRNA, Sigma) and compared with the effects of an equivalent scrambled siRNA from the same supplier.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

128 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Cell culture and transfection

COS-7 cells derive from the kidney of a male adult African green monkey and were cultured as described previously (15). A10 cells (35), which derive from rat embryonic thoracic aorta and retain characteristics of vascular smooth muscle cells (VSMCs), were cultured as described (15). HL-1 cell line was established from an AT-1 cell-induced subcutaneous tumor excised from an adult female C57BL/6J mouse (36) and was cultured as described (15, 36). Plasmids were transfected alone or cotransfected with HDAC6-specific siRNA with jetPRIME (Polyplus Transfection) following the manufacturer's instructions. pcDNA3.1(+) (Invitrogen) was used as a control in transfections. At the time of transfections cells were washed and transferred to growth medium supplemented with charcoal-stripped fetal bovine serum (Lonza) to eliminate steroids. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with the indicated amounts of aldosterone. When indicated, cells were treated for 4 hours with 1 μ M trichostatin-A (TSA; Sigma), a class I and II HDAC inhibitor (including HDAC6) that induces potent acetylation of Hsp90 (26).

qPCR

COS-7 cells were cotransfected with MR-147-YFP or GFP-GR-encoding plasmids and HDAC6 or scrambled siRNA. Transfected cells were treated with 10nM aldosterone for 2 hours. RNA extraction and gene expression analysis by qPCR were performed essentially as described (32). Primers specific for serum and glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) have also been previously described (32). Proteasome subunit beta type 6 and β -actin were used as internal standards and provided indistinguishable results. For simplicity, we report all qPCR data normalized to β -actin.

Western blot

Mouse Hsp90 α was detected with mouse AC88 monoclonal antibody (Calbiochem). HDAC6 was detected with a rabbit polyclonal antibody (H-300; Santa Cruz Biotechnology). MR was detected with mouse monoclonal antibody rMR365-4D6, developed by Dr Celso Gomez-Sanchez (37) and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA). When indicated, proteins fused to GFP were detected using a polyclonal antibody raised in rabbit (38), kindly provided by Dr Raimundo Freire (Hospital Universitario de Canarias, Canarias, Spain). To control for total protein loading we used monoclonal antibodies against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Abcam) or β -actin (Sigma). Secondary antibodies conjugated with peroxidase (GE Healthcare) were used at 1:20 000 dilution. Western blots were developed with Immobilon-P WesternC kit (Bio-Rad) and signals were detected with a Chemidoc imaging system (Bio-Rad) and quantified with the software provided by the manufacturer (Image Lab, Bio-Rad).

Cell imaging and kinetic analysis of nuclear translocation

Semiquantitative analysis of subcellular distribution in the absence of aldosterone was performed as described previously (15, 39). Briefly, cells were transfected with the indicated combination of plasmids, grown for 48 hours in culture medium supplemented with charcoal-stripped serum. Cells were then

fixed, mounted, and images were taken under a confocal microscope. At least 75 cells per condition were scored into five categories (N, exclusive nuclear localization; N > C, predominant nuclear localization; N = C, even distribution throughout cytosol and nucleus; N < C, predominant cytosolic localization; C, exclusive cytosolic localization). Data are shown as percentage of cells in each category from the total amount of cells scored. To confirm cotransfection with MR-147-YFP, cells were immunostained using primary antibodies against HDAC6 or Hsp90 (see above) and goat antimouse or antirabbit secondary antibodies conjugated to Alexa fluor 594 (Invitrogen) following previously published procedures (15).

Kinetic analysis of aldosterone-induced MR nuclear translocation was performed as previously described (40). Briefly, cells were transfected with MR-147-GFP and grown for 48 hours in DMEM supplemented with charcoal-stripped fetal bovine serum. Cells were then transferred to extracellular saline (in mM: NaCl, 137; KCl, 4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; glucose, 10; HEPES, 10; pH 7.4), placed under a Fluoview 1000 confocal microscope (Olympus) in a temperature-controlled environmental chamber set at 37°C and treated by adding 10nM aldosterone to the medium. Images were collected for 1 hour at a sampling rate of one every 2 minutes. Quantitative analysis of MR-147-GFP distribution was performed frame by frame using the manufacturer's software (Olympus). Photobleaching of GFP over the experimental period was less than 10% of the initial fluorescence. Data processing and sigmoid curve fitting were performed using Igor Pro (Wavemetrics) according to the following equation:

$$F = F_0 + \left[\frac{F_{max} - F_0}{1 + \exp\left(\frac{t_{1/2} - t}{V_n}\right)} \right]$$

where F_0 is the initial nuclear fluorescence, F_{max} is the maximal nuclear fluorescence reached, $t_{1/2}$ is the time (min) at which fluorescence is halfway between F_0 and F_{max} , and V_n is a factor determining how steeply nuclear accumulation changes with time.

In situ proximity ligation assay

MR interaction with Hsp90 was detected by in situ proximity ligation assay (PLA) (41) using a commercially available kit (Duolink, Olink Biosciences). COS-7 cells were transfected with MR-147-HA and WT or K295Q Hsp90-CFP. MR-147-HA was detected using a mouse monoclonal anti-HA antibody (clone HA.11, Covance). Hsp90-CFP was detected using a rabbit polyclonal anti-GFP kindly provided by Dr Raimundo Freire. The antibodies used in the assay were previously validated by immunocytochemistry using previously described procedures (15). Controls for specificity consisted on the omission of either one of the transfected plasmids (MR-147-HA or Hsp90-CFP), omission of either one of the primary antibodies or treating cells with 10nM aldosterone overnight to disrupt MR-Hsp90 interaction. Results were quantified using the software provided by the manufacturer (Duolink Image Tool) and are expressed as average number of puncta/cell area.

Transactivation assays

MR or GR transcriptional activity was assayed in COS-7 or HL-1 cells as previously described (32). Briefly, cells were cotransfected with a plasmid encoding MR or GR with a plasmid

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003		
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion		
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi	
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO		Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		15/02/2017 21:26:03

129 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003		
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion		
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS	
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO		Fecha: 16/02/2017 14:29:18

containing a synthetic promoter containing two copies of the basic hormone-responsive element (HRE) fused to the firefly luciferase gene (GRE2X-luc) and a plasmid containing *Renilla* luciferase under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter (CMV-ren). In certain experiments Hsp90 or HDAC6 constructs were included in the transfection mix as indicated in the text. Total amounts of transfected DNA were kept constant. Cotransfected *Renilla* and firefly luciferase activities were measured sequentially using a commercially available kit (Dual-Glo; Promega). MR-dependent transcriptional activity was calculated as the ratio firefly luciferase/*Renilla* luciferase. To study ligand-dependent MR and GR transcriptional activity in the context of a promoter sequence from an endogenous target gene instead of the synthetic GRE2X enhancer, we took advantage of our previously characterized reporter construct with firefly luciferase under the control of approximately 800 bp of a genomic fragment upstream of the transcriptional start site of mouse neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL or lipocalin 2). Both MR and GR regulate NGAL and its promoter contains a functional HRE (42). Results are given as normalized average \pm SE. EC₅₀ values were calculated from normalized data fitted to a log(agonist) vs response equation with variable slope using Prism 5 (GraphPad).

Immunohistochemical analysis of MR expression and Hsp90 acetylation

Endogenous levels of acetylated Hsp90 were specifically detected using a polyclonal anti Hsp90- α acetyl K294 antibody (Rockland Immunochemicals) on Sprague-Dawley male rats' kidney and heart sections (43). Animal experimentation was performed in accordance with the guidelines of the European Community and approved by our institutional animal care and use committees. Tissues were fixed with paraformaldehyde, embedded in paraffin, and processed for immunohistochemistry after rehydration as described (44). MR staining was performed as described (15) using the 12A7 monoclonal antibody (45). Anti Hsp90- α acetyl K294 antibody was used at 1:200 dilution. Controls omitting the first antibody did not produce any significant signal.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.). Unpaired Student *t* test, one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test, or two-parameter ANOVA with Bonferroni post test were applied as indicated in each Figure.

Results

Hsp90 acetylation at residue K295 alters subcellular localization of naïve MR

Our previously published results demonstrated that naïve MR subcellular localization is shifted toward the nucleus by low Hsp90 expression levels (15). Therefore, we hypothesized that Hsp90 acetylation, a modification that decreases its activity, would also result in enhanced nuclear MR localization. To test this hypothesis we used the

COS-7 cell model, which lacks endogenous expression of the receptor (46). Transfection of MR-147-YFP, a previously characterized and fully functional fluorescent MR derivative with insertion of YFP after amino acid 147 (32, 40), resulted in a heterogeneous subcellular localization of the receptor, with some cells showing predominant cytosolic MR localization while others show various degrees of distribution of MR between the nucleus and the cytosol (Figure 1A). This is consistent with previously published results describing the distribution of MR in the same cell type (15, 47, 48). To test the influence of Hsp90 K295 acetylation on MR subcellular distribution we used acetylation-mimicking mutant Hsp90-K295Q and nonacetylatable mutant K295R (22). All Hsp90 variants were expressed as a fusion protein to CFP, which allowed recording coexpression with MR under the confocal microscope (Figure 1B). Hsp90 mutation did not alter MR total cellular abundance, as assessed by Western blot (Figure 1C). The influence of Hsp90 variants on MR subcellular localization was quantified by imaging and scoring transfected cell into one of five categories. Overexpression of WT or K295R mutant of Hsp90 did not alter naïve MR subcellular localization (Figure 1D). However, overexpression of Hsp90-K295Q, the acetylation-mimicking mutant that produces a loss of Hsp90 activity, significantly shifted MR toward the nucleus in the absence of ligand (Figure 1, B and D).

We have previously described that the immortalized HL-1 cardiomyocyte cell line expresses low levels of endogenous Hsp90, producing a predominantly nuclear localization of naïve MR (15). We took advantage of this model to study the effect of Hsp90 acetylation mutants on MR subcellular distribution in the absence of high levels of competing endogenous Hsp90 expression. Consistent with our previous results using WT MR (15), naïve MR-147-YFP was predominantly nuclear in HL-1 cells; coexpression of WT or K295R Hsp90-CFP reversed this phenotype and shifted MR toward the cytosol (Figure 2). These results are consistent with the findings in the COS-7 cell model and suggest that not only Hsp90 expression levels, but also its acetylation-dependent activity, are important to determining nucleocytoplasmic shuttling of MR.

MR subcellular dynamics depend on the HDAC6-Hsp90 interplay

We next investigated whether altered endogenous Hsp90 acetylation levels in COS-7 cells reproduce the effect found with the acetylation-mimicking mutant. To that end we manipulated expression and activity levels of HDAC6, the enzyme responsible for Hsp90 deacetylation (26, 28–30). WT or dominant-negative mutant HDAC6

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

130 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

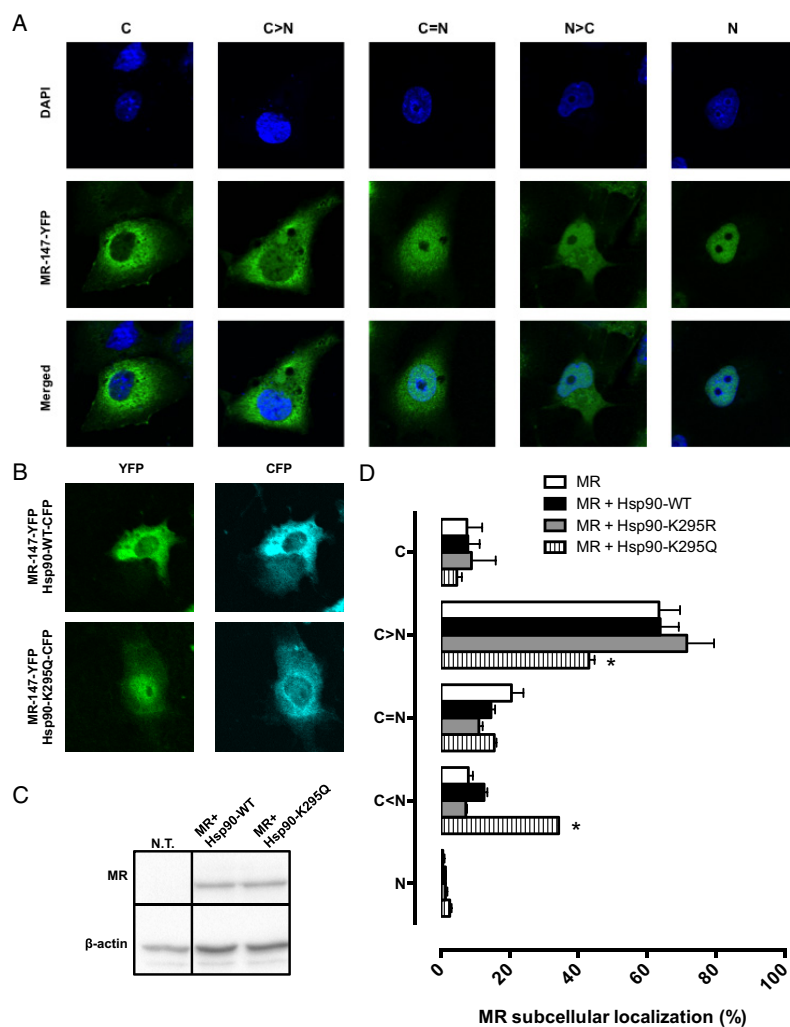


Figure 1. Hsp90 acetylation shifts naïve MR subcellular localization toward the nucleus in COS-7 cells. **A**, Representative images of COS-7 cells transfected with MR-147-YFP showing each category used for scoring the subcellular localization of the receptor in the absence of ligand. At the time of transfection cells were switched to culture medium supplemented with charcoal-stripped fetal bovine serum. Cells were fixed 48 h after transfection, mounted, and images were taken in a confocal microscope. DAPI was included in the mounting medium to counterstain cell nuclei. N, exclusive nuclear localization; N > C, predominant nuclear localization; N = C, even distribution throughout cytosol and nucleus; N < C, predominant cytosolic localization; C, exclusive cytosolic localization. **B**, Representative images of MR subcellular distribution in COS-7 cells cotransfected with Hsp90-WT-CFP or Hsp90-K295Q-CFP. **C**, Western blot analysis of transfected MR expression in COS-7 cells cotransfected with Hsp90-WT or K295Q. N.T., nontransfected cells. β -Actin was used as a loading control. **D**, Quantitative analysis of MR-147-YFP subcellular localization in COS-7 cells cotransfected with an empty plasmid, Hsp90-WT, or mutants K295Q or K295R. Values represent the average percentage of cells in each category from the total amount of cells scored in three independent experiments. *, $P < .05$, one-way ANOVA.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

131 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

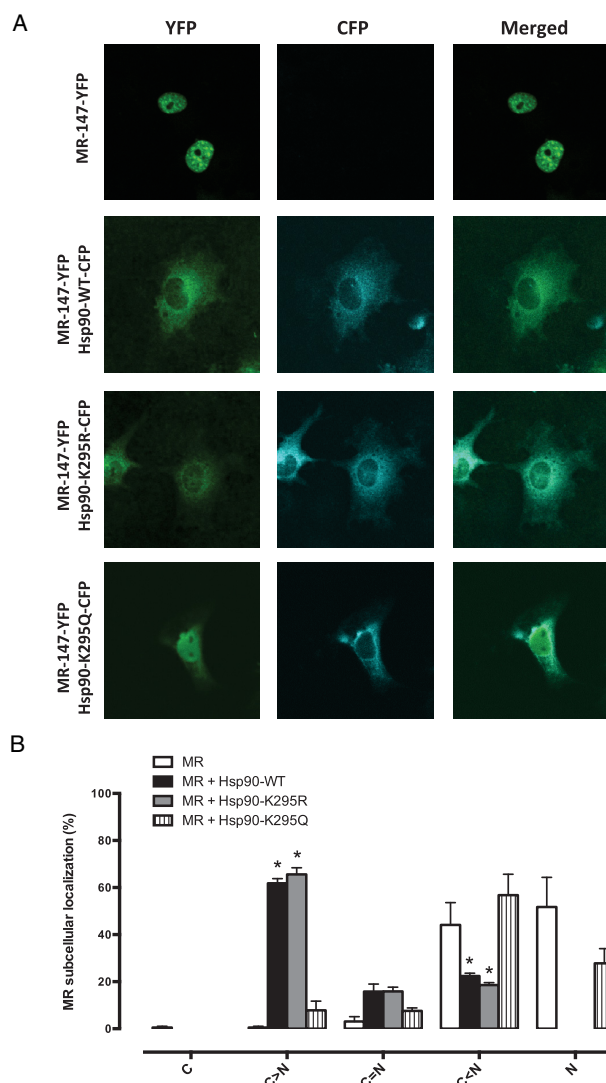


Figure 2. Influence of Hsp90 acetylation on naïve MR subcellular localization in HL-1 cardiomyocytes. A, Subcellular localization of transfected MR-147-YFP in HL-1 cells cotransfected with Hsp90-WT or mutants K295Q or K295R. B, Quantitative analysis of MR-147-GFP subcellular localization in HL-1 cells cotransfected with Hsp90-WT or mutants K295Q or K295R. Values represent the percentage of cells in each category from the total amount of cells scored (N = 3). *, $P < .05$, one-way ANOVA. Subcellular distribution categories were defined as in Figure 1A.

overexpression did not alter cotransfected Hsp90 or MR expression levels (Figure 3, A and B). HDAC6-WT overexpression did not modify naïve MR subcellular localiza-

tion in COS-7 cells (Figure 3, C and D), suggesting that endogenous Hsp90 acetylation in these cells is low. In contrast, overexpression of a catalytically inactive HDAC6 mutant with dominant negative effects [H216A/H611A; HDAC6-DN; (34)] significantly displaced MR toward the nucleus (Figure 3, C and D).

The result described above is consistent with increased Hsp90 acetylation, but could also be due to effects of HDAC6-DN mutant in the acetylation of other target proteins, such as α -tubulin (49). To test whether the change in MR subcellular localization induced by HDAC6-DN is due to changes in the acetylation status K295 in Hsp90 we coexpressed the nonacetylatable form of Hsp90 (K295R). The results showed that mutant K295R reverted the effect of HDAC6-DN on MR subcellular localization (Figure 3D), thus confirming that the effect is not related to HDAC6 off-targets but specifically to the acetylation status of K295 in Hsp90.

To further test the role of HDAC6 in controlling MR subcellular localization we used siRNA to knock-down the expression of this protein in COS-7 cells. We achieved a 50% decrease in HDAC6 protein expression when compared with cells treated with scrambled siRNA, without altering total endogenous Hsp90 expression (Figure 4A). HDAC6 knockdown was corroborated by immunolocalization of endogenous protein expression in the presence of scrambled or anti-HDAC6 siRNAs (Figure 4B). As expected, decreased expression of HDAC6 produced a shift of MR localization toward the nucleus, consistent with a loss of Hsp90 activity due to increased acetylation (Figure 4C). The effect of HDAC6 knockdown was reverted

by coexpression of the nonacetylatable mutant Hsp90-K295R (Figure 4C). Comparison of the amount of cells with MR distribution scoring in conditions C > N and C <

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

132 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

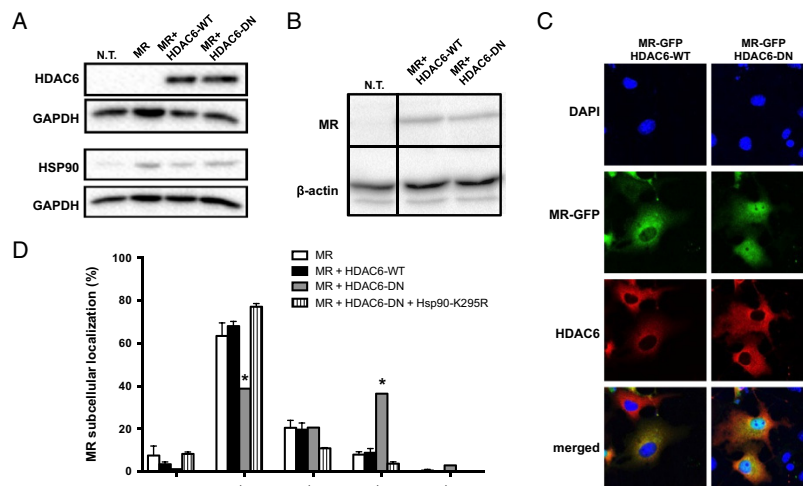


Figure 3. HDAC6-controlled Hsp90 acetylation alters MR subcellular localization. A, Western blot analysis of HDAC6-WT and HDAC6-DN expression after transfection in COS-7 cells; lower panel, Hsp90 expression under the same conditions. B, Western blot analysis of transfected MR expression in COS-7 cells cotransfected with HDAC6-WT or HDAC6-DN. N.T., nontransfected cells. β -Actin was used as a loading control. C, Representative confocal images of COS-7 cells cotransfected with MR-147-GFP and HDAC6-WT or HDAC6-DN. MR was detected by GFP emission; HDAC6 was detected by immunocytochemistry using a secondary antibody conjugated to Alexa-fluor 594. Nuclei were counterstained with DAPI. D, subcellular localization of MR-147-GFP in COS-7 cells cotransfected with HDAC6-WT, HDAC6-DN, or with HDAC6-DN + Hsp90-K295R. Bars represent the average \pm SE of MR subcellular localization from two independent experiments. *, $P < .05$. Subcellular distribution categories were defined as in Figure 1A.

N showed no statistically significant difference between control conditions (MR + scrambled siRNA) and HDAC6 knockdown with coexpressed Hsp90-K295R. This further confirms that the effect of manipulating HDAC6 on MR localization is not due to changes in acetylation of other HDAC6 target proteins. Finally, pharmacological inhibition of class I and class II HDACs, which include HDAC6, by pretreating cells with $1\mu\text{M}$ TSA for 4 hours also induced a significant shift in MR subcellular localization toward the nucleus (Figure 4C). Taken together, these results demonstrate that HDAC6-controlled Hsp90 acetylation at residue K295 alters MR subcellular distribution in the absence of ligand.

Acetylation partially impairs Hsp90 interaction with MR

It has been previously described that acetylation at K295 (K294 in *H. sapiens* Hsp90 α) weakens the interaction of Hsp90 with various client proteins, including AR (22) and GR (26). To quantitatively assess whether K295 acetylation also controls Hsp90 interaction with MR we used in situ PLA, a method that detects close proximity between single molecules (41). COS-7 cells were cotransfected with MR with an HA epitope tag (MR-147-HA)

and WT or K295Q mutant Hsp90-CFP. Both conditions produced PLA-positive signals in the form of discrete dots in the cytosol of cells (Figure 5A). Quantitative image analysis showed a 35% decrease in the amount of positive MR-Hsp90-K295Q complexes compared with Hsp90-WT (Figure 5B). Nontransfected cells produced a very low dot density (approximately 0.3% that of transfected cells; Figure 5B). Cells treated with 10nM aldosterone overnight to disrupt the interaction between MR and Hsp90 totally eliminated the PLA signal (Figure 5, A and B). In conclusion, Hsp90 acetylation partially disrupts interaction of the chaperone with MR.

Hsp90 acetylation accelerates aldosterone-induced MR nuclear translocation

Hsp90 is not only important to control steroid receptor subcellular localization but is also essential to maintain a ligand binding competent conformation and, once the ligand is bound to the receptor, to chaperone its nuclear translocation (18). To test whether Hsp90 acetylation affects ligand-induced MR nuclear translocation we used confocal microscopy analysis of living COS-7 cells transfected with MR-147-GFP with or without cotransfecting WT Hsp90 or mutants K295Q or K295R. Nuclear trans-

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

133 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

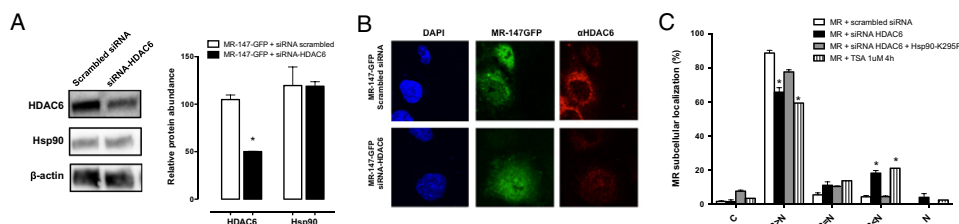


Figure 4. siRNA-mediated HDAC6 knockdown or pharmacological inhibition of type I/type II HDACs shift naive MR toward the cell nucleus. A, Western blot analysis of siRNA-mediated HDAC6 knockdown, showing endogenous HDAC6 expression in COS-7 cells transfected with control (scrambled) siRNA or anti-HDAC6 specific siRNA. Hsp90 expression in the same cells is also shown. Anti-β-actin was used as loading control. Bars represent average band intensity (± SE; n = 3) corrected by β-actin and normalized to control; *, P < .01, Student t test. B, Immunofluorescence localization of HDAC6 in COS-7 cells cotransfected with scrambled siRNA or anti-HDAC6 siRNA. C, Subcellular localization of MR-147-GFP in COS-7 cells cotransfected with control (scrambled) siRNA or anti-HDAC6 siRNA and Hsp90–K295R, or in cells pretreated for 4 h with 1 μM with TSA. Bars represent the average ± SE of MR subcellular localization from two independent experiments. *, P < .05. Subcellular distribution categories were defined as in Figure 1A.

location was complete within 1 hour in every condition tested (Figure 6, A and B). However, in the presence of Hsp90-K295Q, aldosterone-induced MR nuclear translocation showed a faster translocation half-time when compared with conditions without overexpressed Hsp90 or when Hsp90-WT or K295R were cotransfected ($t_{1/2}$ = 10 min for MR + Hsp90-K295Q, 20.6 min for MR, 26.3

min for MR + Hsp90-WT, and 30.3 min for MR + Hsp90-K295R; Figure 6B). All other parameters derived from sigmoid fitting of the data points were not statistically different between conditions (Figure 6B). These results demonstrate that the initial steps of aldosterone-induced MR nuclear translocation are controlled by Hsp90 acetylation, although the hormone is able to induce full-

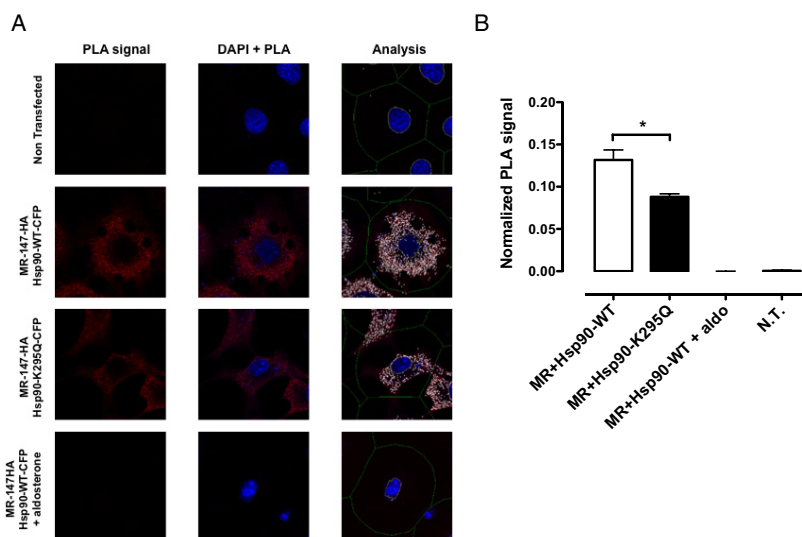


Figure 5. Mutation mimicking Hsp90 acetylation (Hsp90–K295Q) partially impairs MR-Hsp90 interaction. A, In situ proximity ligation assay (PLA) detecting MR-Hsp90 interactions. Cells were fixed and after the PLA reaction was finished coverslips were mounted in the presence of DAPI to counterstain nuclei. Left column shows representative images of the PLA reaction obtained in nontransfected COS-7 cells, cells cotransfected with MR-147-HA, and WT or K295Q Hsp90, or cells cotransfected with MR-147-HA and WT Hsp90 and then treated with 10nM aldosterone overnight. Middle column shows merged images with PLA signals and DAPI-stained nuclei. Right column shows PLA signal detection by analysis software. B, Quantitative analysis of PLA signals. Bars represent the number of discrete dots normalized by cell area ± SE (n = 19–22). *, P < .01, one-way ANOVA followed by Dunn’s multiple comparison test.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

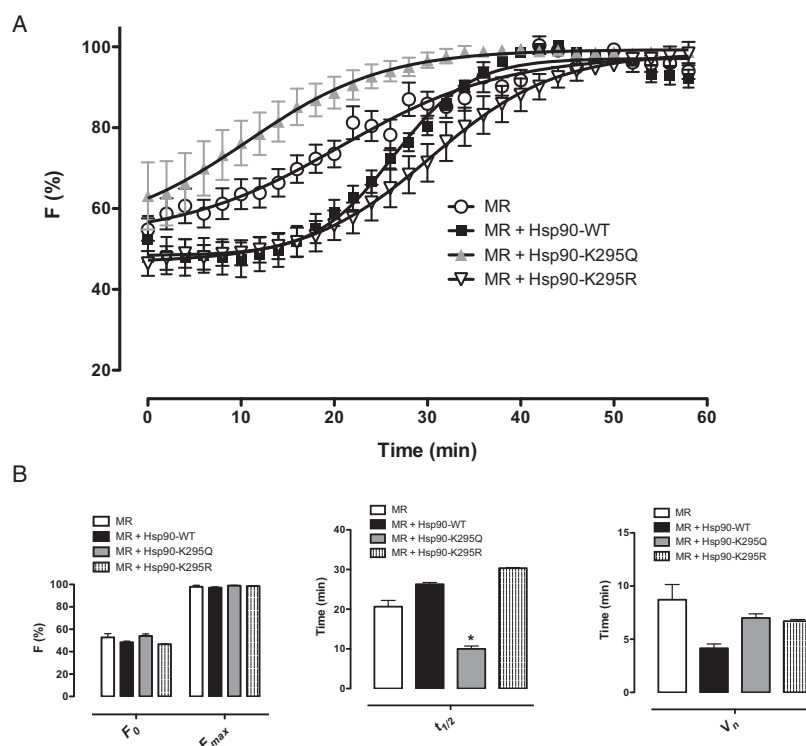


Figure 6. Hsp90-K295Q modifies the kinetics of aldosterone-induced MR nuclear translocation. A, COS-7 cells transfected with the indicated combinations of MR-147-GFP and WT or mutant Hsp90 were placed under a confocal microscope and treated with 10nM aldosterone (time 0 indicates hormone addition). Individual points represent the average percentage fluorescent intensity of the nucleus vs total cellular fluorescence (F) measured in individual cells at the indicated time (\pm SE; $n = 5-13$). Data points were fitted to Boltzmann sigmoidal curves ($R^2 > 0.98$ in each case). B, Translocation kinetic parameters derived from curve fitting shown in panel A. Bars represent average \pm SE of the parameters indicated in each plot. F_0 , bottom of the curve; F_{max} , top of the curve; $t_{1/2}$, halfway between F_0 and F_{max} ; V_n , steepness of the curve. *, $P < .05$, one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test.

nuclear translocation within 1 hour in every experimental group.

Hsp90 acetylation differentially affects ligand-dependent MR and GR transcriptional response

To test whether MR activity is affected by Hsp90 acetylation we examined aldosterone-dependent transactivation of a synthetic promoter containing two hormone response elements, GRE2X. Cotransfection of MR and Hsp90 with GRE2X-luc reporter gene in COS-7 cells and overnight treatment with increasing doses of aldosterone produced the expected dose-dependent response with an EC_{50} of approx. 0.1nM (Figure 7A). Hsp90-K295Q did not alter aldosterone apparent affinity for MR ($EC_{50} = 0.09-0.10$ nM) or the efficacy of the receptor (Figure 7A).

Given that mutation K295Q does not recapitulate all features of Hsp90 acetylation (22) we decided to test the effect of manipulating endogenous Hsp90 acetylation levels on MR activity. To that end we used overexpression of HDAC6 mutants or siRNA-mediated knockdown. COS-7 cells expressing MR together with WT or dominant-negative HDAC6 did not show any difference in aldosterone-induced transactivation of GRE2X ($EC_{50} = 0.05-1.2$ nM; Figure 7B), consistently with the results obtained overexpressing Hsp90-WT or K295Q. Interfering HDAC6 expression with siRNA also failed to alter MR/aldosterone-induced gene transactivation (Figure 7C). To compare the effect of HDAC6 knockdown on MR and GR activity, we next examined GR/cortisol-induced transactivation. Anti-

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

135 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

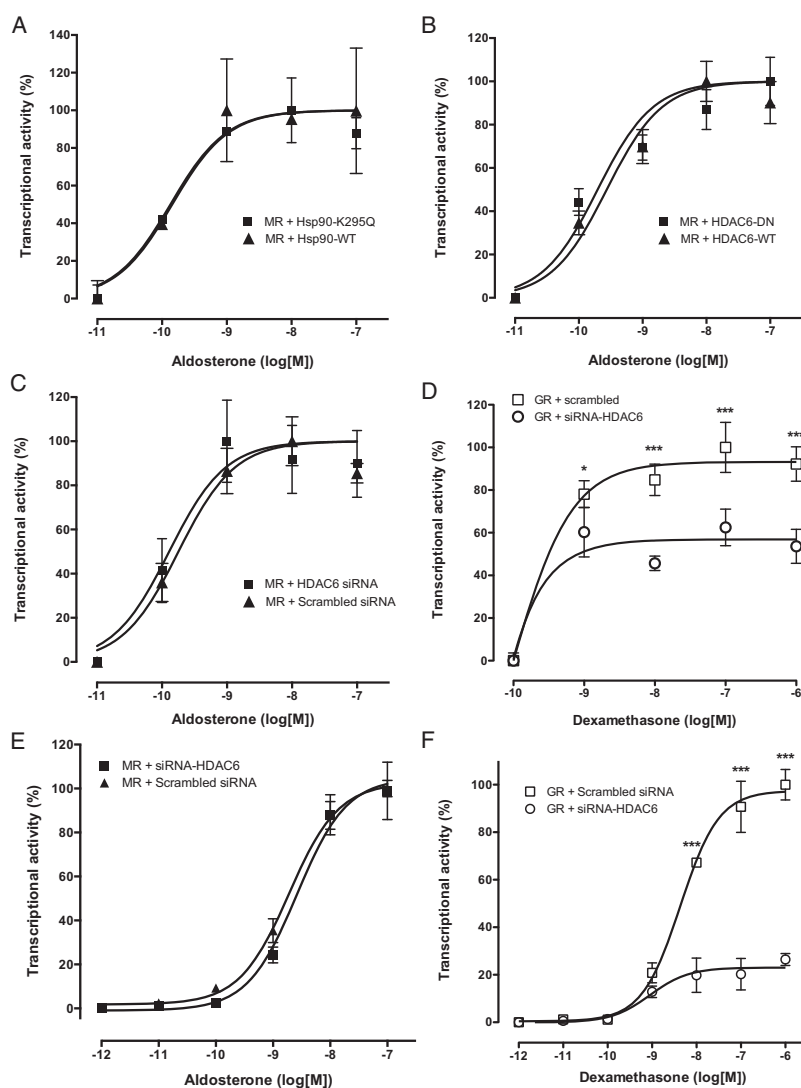


Figure 7. Hsp90 acetylation does not affect MR transcriptional efficacy but diminishes GR activity. A, Transactivation of a GRE2X-luc construct by MR cotransfected with WT or mutant Hsp90 in COS-7 cells treated with the indicated doses of aldosterone for 16 h. Individual points represent the average \pm SE ($n = 6$) normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. Data points were fitted to a log (agonist) vs response model (three parameters) using Prism 5 software. B, Transactivation of a GRE2X-luc construct by MR in the presence or absence of WT or dominant-negative HDAC6 cotransfected in COS-7 cells and treated with the indicated doses of aldosterone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 3$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. C, Transactivation of a GRE2X-luc construct by MR in COS-7 cells cotransfected with scrambled or anti-HDAC6 siRNA and treated with the indicated doses of aldosterone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 5$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. D, Transactivation of a GRE2X-luc construct by GR in COS-7 cells cotransfected with scrambled or anti-HDAC6 siRNA and treated with the indicated doses of dexamethasone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 3$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. E, Transactivation of a GRE2X-luc construct by MR in HL-1 cells cotransfected with

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

136 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

HDAC6 siRNA produced the expected decrease in GR activity (Figure 7D), as described (26).

To test the effects of HDAC6 knockdown on MR and GR transcriptional activity in a cellular background with low levels of Hsp90 (15), we used HL-1 cardiomyocytes as an expression system. Again, anti-HDAC6 siRNA had no effect on MR when compared with scrambled siRNA, but potentially diminished GR activity (Figure 7, E and F).

We next tested whether the differential regulation of MR and GR by HDAC6 knockdown depends on the specific promoter used to drive the reporter gene. To that end, we used a luciferase reporter under the control of the mouse NGAL promoter, which contains a functional HRE that confers MR- and GR-dependent regulation (42). Our results showed that aldosterone-MR-dependent reporter up-regulation was dose dependent and was not affected by HDAC6 knockdown (Figure 8A). In contrast, dexamethasone-GR-dependent up-regulation was significantly diminished by HDAC6 knockdown (Figure 8B). This effect was apparent both in the context of high Hsp90 expression (COS-7 cells; Figure 8, A and B) or low Hsp90 expression (HL-1 cells; Figure 8, C and D).

Taken together, these results suggest that HDAC6-dependent Hsp90 acetylation does not affect MR transactivation of target genes. This stands in contrast with the effect of HDAC6 on decreasing GR activity, suggesting a regulatory mechanism that could dynamically alter the relative contribution of corticosteroid receptors to gene regulation.

In vivo Hsp90 acetylation is prominent in VSMCs

We next tested whether we could detect cell type-specific Hsp90-K295 acetylation in tissues where MR activity has important functional roles. To that end we used a commercially available anti-Hsp90-acetyl-K295 polyclonal antibody (31) on rat kidney and heart sections. Kidney glomeruli or renal tubules did not show any detectable level of acetylated Hsp90 (Figure 9A). In contrast, clear labeling was detected in intracortical arteries and arterioles, with a pattern consistent with localization of the modified Hsp90 in smooth muscle cells (Figure 9A). For comparison, we stained rat kidney cortex with anti-MR antibodies, which produced clear labeling of distal nephron, but not proximal tubules (Figure 9B). Preliminary experiments staining sections from aldosterone-treated animals did not show any apparent change in labeling (N. Farman and F. Jaisser, unpublished observations). Heart sections also showed exclusive acetylated

Hsp90 staining in smooth muscle cells of coronary arteries (Figure 9D), whereas anti-MR antibodies marked cardiomyocytes nuclei (Figure 9E). Therefore, acetylated Hsp90 is not detected in the aldosterone-sensitive nephron or in cardiac myocytes but is present in VSMC.

Hsp90 acetylation and MR activity in VSMCs

Given the prominent Hsp90 acetylation detected in VSMCs we used A10 cells, a cell line derived from rat embryo thoracic aorta that retains VSMC characteristics (35), to further study MR activity regulation by HDAC6-dependent Hsp90 acetylation and compare it with GR activity. To that end we cotransfected A10 cells with MR or GR with control or HDAC6-specific siRNA and luciferase reporter plasmids under the control of GRE2X synthetic promoter (Figure 10, A and B) or NGAL promoter (Figure 10, C and D). Hormone dose-dependent transactivation curves demonstrated that regardless of the promoter used MR function was unaffected by HDAC6 knockdown (Figure 10, A and C). In contrast, GR-dependent transactivation of both GRE2X and NGAL promoters was significantly diminished (Figure 10, B and D). These data are consistent with the results obtained in COS-7 and HL-1 cells. Finally, we also tested whether MR and GR regulation of a target endogenous gene was differentially affected. SGK1 induction by MR/aldosterone was unaffected by HDAC6 knockdown (Figure 10E). In contrast, SGK1 induction by GR/dexamethasone was significantly lower in cells cotransfected with HDAC6 siRNA, consistently with results obtained in COS-7 cells. In summary, it seems that the differential effect of HDAC6 knockdown on MR and GR activities does not depend on the cellular context.

Discussion

Here we show that increased level of Hsp90 acetylation at residue K295 shifts naive MR subcellular distribution toward the nucleus and accelerates ligand-induced nuclear translocation, but has no apparent effect on gene transactivation. This stands in contrast with the large and differential effect of Hsp90 acetylation on the activity of related steroid receptors. For instance, naive AR abundance and subcellular localization is independent of Hsp90 acetylation or HDAC6 activity (28). This study also showed that HDAC6 knockdown inhibited AR target gene ex-

Figure 7. (Continued). scrambled or anti-HDAC6 siRNA and treated with the indicated doses of aldosterone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 3$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. F, Transactivation of a GRE2X-luc construct by GR in HL-1 cells cotransfected with scrambled or anti-HDAC6 siRNA and treated with the indicated doses of dexamethasone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 3$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. The influence of hormone addition and cotransfected factor was tested in every case by a two-parameter ANOVA followed by Bonferroni post tests. *, $P < .05$; ***, $P < .001$.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

137 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdvrOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

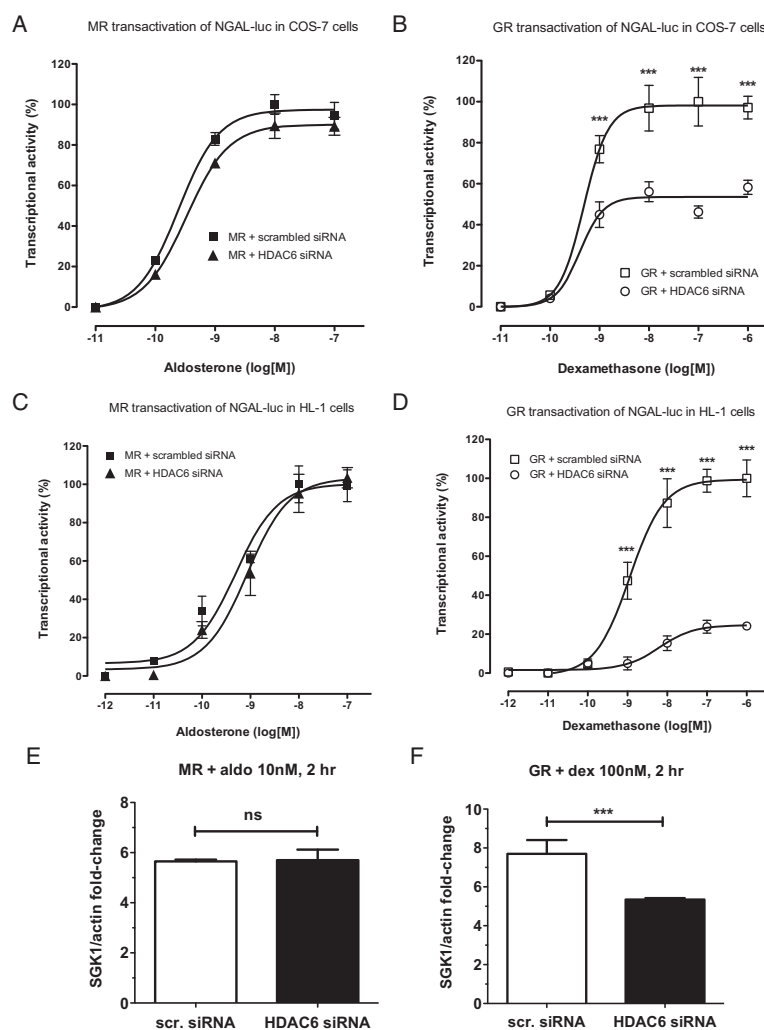


Figure 8. HDAC6 down-regulation differentially affects MR and GR-mediated transcriptional activation of cellular promoters. A, Transactivation of a reporter luciferase gene under the control of the mouse NGAL gene promoter fragment in COS-7 cells cotransfected with MR and scrambled or anti-HDAC6 siRNA and treated with the indicated doses of aldosterone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 3$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. B, Transactivation of NGAL-luciferase reporter in COS-7 cells cotransfected with GR and scrambled or anti-HDAC6 siRNA and treated with the indicated doses of dexamethasone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 3$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. C and D, Experiments equivalent to those shown in panels A and B (NGAL-luciferase induction mediated by MR- or GR-dependent transactivation) but performed in HL-1 cells. E, Induction of endogenous SGK1 expression after treatment with 10nM aldosterone for 2 h in COS-7 cells cotransfected with MR and scrambled or anti-HDAC6 siRNA. Bars represent average \pm SE fold change in SGK1 mRNA abundance normalized by β -actin expression levels ($n = 3$). F, Induction of endogenous SGK1 expression after treatment with 100nM dexamethasone (dex) for 2 hours in COS-7 cells cotransfected with GR and scrambled or anti-HDAC6 siRNA. Bars represent average \pm SE fold change in SGK1 mRNA abundance normalized by β -actin expression levels ($n = 3$). Statistical analysis: for experiments shown in panels A–D, the influence of hormone addition and cotransfected factor was tested by a two-parameter ANOVA followed by Bonferroni post tests. ***, $P < .001$. For experiments shown in panels E and F, results were compared using an unpaired *t* test. n.s., Not significant; ***, $P < .001$.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

138 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

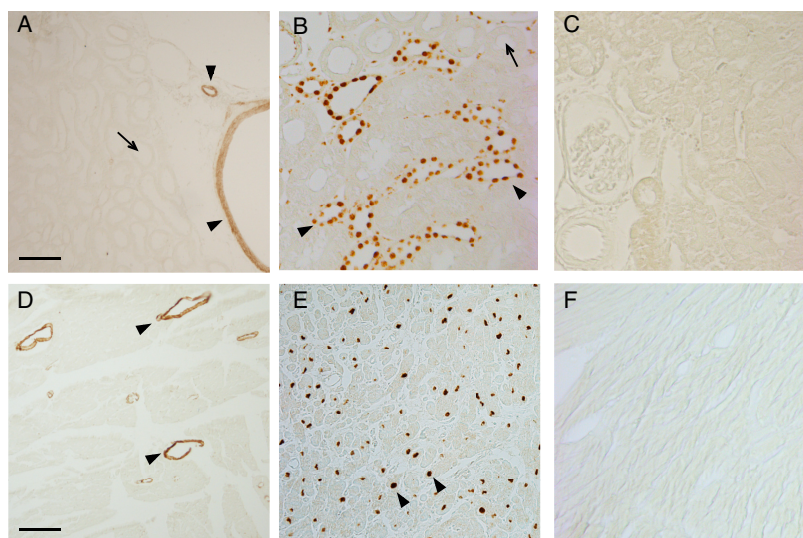


Figure 9. Immunohistochemical analysis of Hsp90 acetylation in rat kidney and heart shows predominant labeling in vascular smooth muscle cells. A, Representative micrograph of a paraffin-embedded section of rat kidney cortex stained with anti-Hsp90-acetyl-K295 antibody. Staining was restricted to renal arteries and arterioles (arrowheads). Renal tubules were negative for anti-Hsp90-acetyl-K295 staining (arrow). B, Rat kidney cortex stained with 12A7 anti-MR antibody. Staining is prominent in distal nephron (arrowheads) but negative in proximal tubules (arrow). C, Negative control of rat kidney cortex obtained omitting the primary anti-Hsp90-acetyl-K295 antibody. D, Representative micrograph of rat heart stained with anti-Hsp90-acetyl-K295 antibody. Staining was restricted to coronary arteries and arterioles (arrowheads). E, Rat heart stained with anti-MR antibody. Cardiomyocyte nuclei are clearly stained (arrowheads). F, Negative control of rat heart obtained omitting the primary anti-Hsp90-acetyl-K295 antibody. Bars in panels A and D, 50 μ m.

pression by approximately 50% and that androgen hypersensitivity depends on HDAC6-controlled Hsp90 acetylation/deacetylation and regulation of AR (28). Down-regulation of AR signaling by Hsp90 acetylation was confirmed in an independent study using a pharmacological inhibitor of HDAC6, although in this case Hsp90 acetylation did result in a decrease in AR expression (29). In contrast, Hsp90 acetylation in an HDAC6-regulated manner does not affect GR abundance but diminishes ligand binding, nuclear translocation, and gene transactivation (26, 27, 30). These effects can be entirely explained by rapid assembly-disassembly of GR-Hsp90 complexes, resulting in a loss in the proportion of the receptors available for ligand binding at any given time (30). The effects of Hsp90 acetylation or HDAC6 depletion on MR had not been tested previously. It could be anticipated that the effects of acetylation-dependent Hsp90 degradation should be similar to pharmacological inhibition of Hsp90 activity. Faresse et al (50) demonstrated that inhibiting Hsp90 chaperone activity with tanespimycin induced the recruitment of the ubiquitin ligase CHIP, MR ubiquitylation, and subsequent receptor degradation and loss of transcriptional activity. In a dif-

ferent study, Grosman et al (19) did not find alteration of MR levels by geldanamycin, a related Hsp90 inhibitor, but did report a decrease in nuclear translocation and inhibition of transactivation. Interestingly, this last study also reported that Hsp90 inhibition partially prevented MR, but no GR binding to DNA, already suggesting differential effects of the chaperone between both receptors. Our study clearly shows that acetylation of Hsp90 at residue K295 is not equivalent to pharmacologically inhibiting Hsp90 activity. Acetylation does not alter MR expression level, shifts naive MR toward the nucleus, and makes ligand-induced nuclear translocation faster instead of preventing it.

Altered MR nuclear translocation in response to decreased Hsp90 activity is predictable. It has become clear that after ligand binding Hsp90 transiently continues to be bound to MR and mediates interaction with nuclear translocation machinery (18, 19). Ligand binding to MR induces the release of FKBP51 and recruitment of FKBP52, both Hsp90-interacting protein, linking the Hsp90-MR heterocomplex to dynein/dynactin motors that mediate MR nuclear import (18, 51). It is important to point out that while our results suggest a differential effect of Hsp90

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

139 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

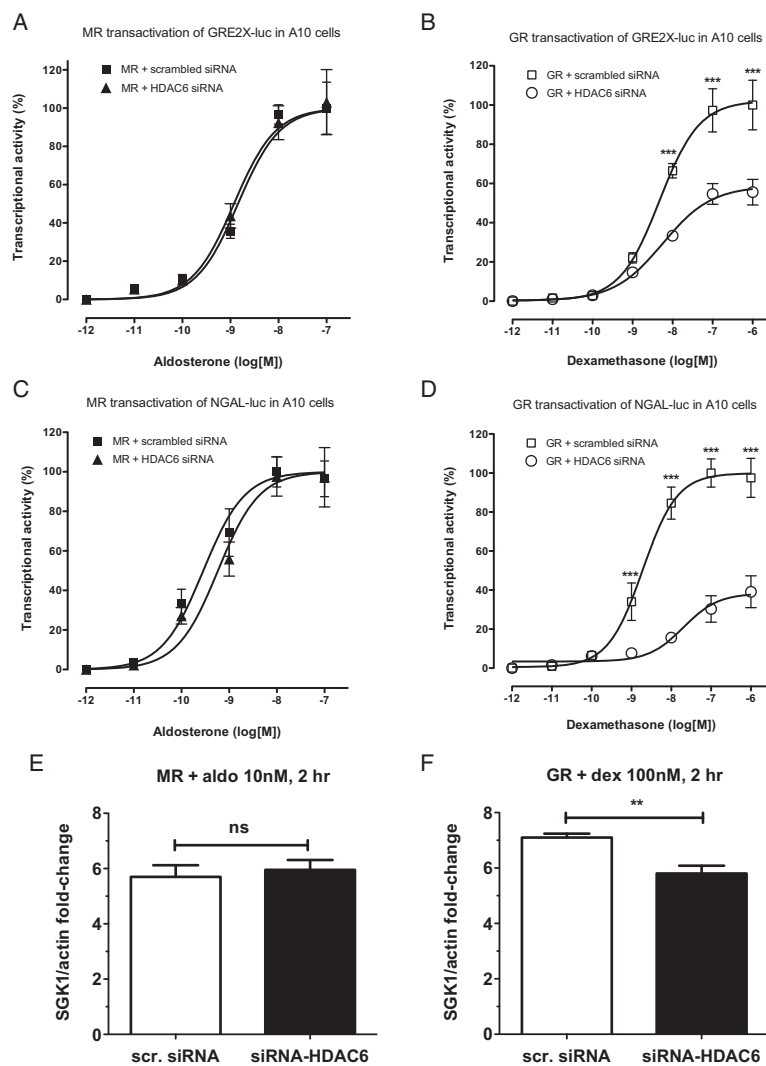


Figure 10. Effects of HDAC6 down-regulation on MR and GR transcriptional activity in A10 vascular smooth muscle cell line. A, Transactivation of GRE2X-luciferase reporter in A10 cells cotransfected with MR and scrambled or anti-HDAC6 siRNA and treated with the indicated doses of aldosterone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 3$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. B, Transactivation of GRE2X-luciferase reporter in A10 cells cotransfected with GR and scrambled or anti-HDAC6 siRNA and treated with the indicated doses of dexamethasone for 16 h. Individual points represent the average ($n = 3$) \pm SE normalized firefly luciferase/*Renilla* luciferase values. C and D, Experiments equivalent to those shown in panels A and B but performed using the NGAL-luciferase reporter gene. E, Induction of endogenous SGK1 expression after treatment with 10nM aldosterone for 2 h in A10 cells cotransfected with MR and scrambled or anti-HDAC6 siRNA. Bars represent average \pm SE fold change in SGK1 mRNA abundance normalized by β -actin expression levels ($n = 3$). F, Induction of endogenous SGK1 expression after treatment with 100nM dexamethasone (dex) for 2 hours in A10 cells cotransfected with GR and scrambled or anti-HDAC6 siRNA. Bars represent average \pm SE fold change in SGK1 mRNA abundance normalized by β -actin expression levels ($n = 3$). Statistical analysis: for experiments shown in panels A–D, the influence of hormone addition and cotransfected factor was tested by a two-parameter ANOVA followed by Bonferroni post tests. ***, $P < .001$. For experiments shown in panels E and F, results were compared using an unpaired *t* test. n.s., Not significant; **, $P < .001$.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

140 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

acetylation in controlling GR and MR activity, the cotransfection reporter gene assay is biased toward long induction times. At shorter inductions (<1 h) it is difficult to assess transcriptional activity. Aldosterone-mediated transcriptional response has been traditionally characterized as comprising an early (1–3 h after stimulus) and a late phase (>3 h), a classification that is mainly based on the action of MR on transepithelial Na⁺ transport and the regulation of the underlying channels and transporters (52). A change in nuclear translocation kinetics may alter the onset of first phase of aldosterone response, although after 1 hour the translocation of MR is complete. Consistent with this, our measurements of endogenous SGK1 induction by MR after stimulation with aldosterone for 2 hours did not show any significant alteration when HDAC6 was knocked down. This stands in contrast with the regulation of GR, which we found to be significantly inhibited by HDAC6 knockdown, in agreement with previous studies (26, 27, 30), both at long (16-h) and at short (2-h) induction times. However, the lack of effect of HDAC6 on MR-dependent induction of SGK1 does not preclude the possibility that earlier induction of this or other target genes, or even the early onset of nongenomic responses, may be affected by Hsp90 acetylation.

HDACs have a well-established and wider role in nuclear receptor activity. For instance, selective inhibition of class I or class II have differential effects on GR transcriptome (53). Regarding MR, Lee et al (54), recently demonstrated that direct modification of MR by acetylation decreases its activity attenuating hypertension and associated cardiac hypertrophy and fibrosis (54, 55). MR acetylation is promoted by CBP/p300 (56) whereas deacetylation is catalyzed solely by HDAC3 (54), a class I HDAC, although HDAC4 participates in MR regulation by promoting HDAC3 and MR interaction (57). Class II inhibitors, which block HDAC6, did not alter MR activity (54, 57). In addition, our experiments show that the effect of HDAC6 loss on MR subcellular localization was reverted by coexpression of a nonacetylatable form of Hsp90, mutant K295R. This phenotypic rescue demonstrates that the effects of HDAC6 on MR localization are directly mediated by increased acetylation of residue K295 in Hsp90.

The results of this study suggest that Hsp90 acetylation may play a role in balancing relative levels of MR and GR activity. This is a particularly interesting possibility in cells expressing little or no 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 2 (HSD2), such as VSMC. HSD2 metabolizes the main glucocorticoids (cortisol and corticosterone) to an inactive metabolite (cortisone), providing a local environment protected from the high circulating levels of glucocorticoids so aldosterone can access MR and differentially regulate gene expression (58). This is particularly impor-

tant in classic aldosterone-target tissues, where HSD2 is essential in ensuring mineralocorticoid selectivity to control BP. However, in cells lacking HSD2 and coexpressing GR and MR, glucocorticoids can potentially act through both receptors. This is functionally relevant given that GR and MR physiological functions are distinct and not exchangeable (59). We speculate that increased Hsp90 acetylation in the absence of HSD2 may alter the balance between GR- and MR-mediated glucocorticoid-induced gene transcriptional responses. This could be the case in VSMC, where our results show that Hsp90-K295 acetylation is abundant. Another interesting possibility worth exploring in the future is the hippocampus, where there is prominent expression of MR and GR and the relative balance of activity between both receptors is functionally important (60).

Even in cells expressing HSD2, such as those of the distal nephron, a possible differential regulation of MR and GR by Hsp90 acetylation may still be important. These cells coexpress MR and GR at a 1:2 ratio and even though HSD2 provides a low glucocorticoid local environment, sufficient unmetabolized hormone may remain so it can activate both receptors (59). Testing this possibility would require the use of cells with different levels of HSD2 activity. This was not directly addressed in our study. Previous reports showed that COS-7 cells lack endogenous HSD2 expression (61, 62). In contrast, others studies found significant enzymatic activity in these cells and the related CV-1 cell line, although it seems that the enzyme did not play a significant role in determining mineralocorticoid selectivity of MR (63). Regarding HL-1 cells, it seems that this line expresses low levels of HSD2 mRNA (64). However, we have observed that cortisol induction of MR activity occurs with the normal dose dependence, implying that there is no discernible enzymatic HSD2 activity in these cells (Jimenez-Canino and Alvarez de la Rosa, unpublished results).

An important question regarding the differential control of steroid receptor activity by acetylation relates to the physiological control of acetylation-deacetylation cycle of the receptors themselves or associated, functionally relevant proteins such as Hsp90. The mechanisms regulating HDAC6 itself, regarding its enzymatic activity and subcellular trafficking mechanisms, as well as its cell type-specific modulation, are still poorly known (65). It has been shown that at least in a cultured cell line a GR agonist such dexamethasone increases Hsp90 acetylation when HDAC6 is down regulated (26), suggesting a potential negative feedback mechanism to control the activity of the receptor. In contrast, no evidence for aldosterone-induced MR acetylation was found in transfected HEK293 cells (54). However, classical biochemical work shows rapid

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

141 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

aldosterone-induced changes in histone acetylation in kidney tissue extracts (66). The physiological relevance of these observations is at this point still unclear.

In summary, we have shown that HDAC6-controlled Hsp90 acetylation at residue K295 significantly alters MR subcellular dynamics but does not have an effect on transcriptional activity, at least in the late phase of the response. Comparing these data with the known actions of Hsp90 acetylation on GR activity suggests that Hsp90 acetylation may provide an important control point for differentially regulating these two highly related steroid receptors.

Appendix

Antibody Table.

Table A1. Antibody Table

Peptide/Protein Target	Antigen Sequence (if known)	Name of Antibody	Manufacturer, Catalog Number, and/or Name of the Individual Providing the Antibody	Species Raised in; Monoclonal or Polyclonal	Dilution Used
HDAC6	Amino acids 916–1215 mapping at the C terminus of HDAC6 of human origin	H-300	Santa Cruz Biotechnology, catalog No. sc-11420	Rabbit polyclonal	1:1000 (WB); 1:200 (IF)
Hsp90	Full-length Hsp90 isolated from water mold, <i>Achlya ambisexualis</i>	AC88	Millipore (Calbiochem), catalog No. 386040	Mouse monoclonal	1:2000 (WB)
Human Hsp90 acetylated at residue K294	Synthetic peptide corresponding to amino acids surrounding K294 of human Hsp90 α	HSP90 K294	Rockland Immunochemicals, catalog No. 600-401-981	Rabbit polyclonal	1:200 (IHC)
MR	Rat mineralocorticoid receptor amino acids 365–381	rMR365 4D6	Dr Celso Gomez-Sanchez (antibody available through the Developmental Studies Hybridoma Bank, product No. rMR365 4D6)	Mouse monoclonal	Undiluted hybridoma supernatant (WB)
MR	Rat mineralocorticoid receptor amino acids 1–18	MR1–18 12A7	Dr Celso Gomez-Sanchez [described in Gomez-Sanchez et al. (45)]	Mouse monoclonal	1:100 (IHC)
GFP	eGFP expressed in <i>E. Coli</i>	Anti-GFP	Dr Raimundo Freire [described in Refolio et al. (38)]	Rabbit polyclonal	1:3000 (WB); 1:1000 (IF); 1:200 (PLA)
GAPDH	Full-length native protein from human erythrocytes	Anti-GAPDH	Abcam, catalog No. 9484	Mouse monoclonal	1:10 000 (WB)
β -Actin	SGPSIVHRKCF	AC-40	Sigma-Aldrich, catalog No. A3853	Mouse monoclonal	1:1000 (WB)
HA epitope	CYPYDVPDYASL	HA.11 clone 16B12	Covance, catalog No. MMS-101R	Mouse monoclonal	1:1000 (WB); 1:1000 (IF); 1:200 (PLA)
IgG heavy chains and all classes of immunoglobulin light chains from rabbit		Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) Antibody	Life Technologies (Molecular Probes), catalog No. A-11037	Goat polyclonal	1:500 (IF)
IgG heavy chains and all classes of immunoglobulin light chains from mouse		Alexa Fluor 594 Goat Anti-Mouse IgG (H + L) Antibody	Life Technologies (Molecular Probes), catalog No. A-11005	Goat polyclonal	1:500 (IF)
Purified immunoglobulin fractions from normal rabbit serum		Amersham ECL Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab	GE Healthcare (Amersham), catalog No. NA931	Donkey polyclonal	1:20 000 (WB)
Purified immunoglobulin fractions from normal mouse serum		Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab	GE Healthcare (Amersham), catalog No. NA934	Sheep polyclonal	1:20 000 (WB)

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

142 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

Program (Ministerio de Educación, Spain). T.G. was supported by the Ramon y Cajal Program (MINECO).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: Structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 1987; 237(4812):268–275.
- Fuller PJ, Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension*. 2005;46(6):1227–1235.
- Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, et al. Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science*. 2000;289(5476):119–123.
- Geller DS, Rodriguez-Soriano J, Vallo Boado A, et al. Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypaldosteronism type I. *Nat Genet*. 1998;19(3):279–281.
- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001;104(4):545–556.
- Lombès M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res*. 1992;71(3):503–510.
- Reul JM, Pearce PT, Funder JW, Krozowski ZS. Type I and type II corticosteroid receptor gene expression in the rat: Effect of adrenalectomy and dexamethasone administration. *Mol Endocrinol*. 1989; 3(10):1674–1680.
- Jaisser F, Farman N. Emerging roles of the mineralocorticoid receptor in pathology: Toward new paradigms in clinical pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2016;68(1):49–75.
- McCurley A, Pires PW, Bender SB, et al. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med*. 2012;18(9):1429–1433.
- Farman N, Maubec E, Poeggeler B, Klatte JE, Jaisser F, Paus R. The mineralocorticoid receptor as a novel player in skin biology: Beyond the renal horizon? *Exp Dermatol*. 2010;19(2):100–107.
- Feraco A, Armani A, Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M. Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;137:99–106.
- Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(2):174–180.
- Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Central regulation of blood pressure by the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;350(2):289–298.
- Joels M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 2008;583(2–3):312–321.
- Hernández-Díaz I, Giraldez T, Arnau MR, et al. The mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive nuclear localization signals. *Endocrinology*. 2010; 151(8):3888–3899.
- Gekle M, Bretschneider M, Meinel S, Ruhs S, Grossmann C. Rapid mineralocorticoid receptor trafficking. *Steroids*. 2014;81C:103–108.
- Erlejan AG, Lagadari M, Toneatto J, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD. Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(2):71–87.
- Galigniana MD, Erlejan AG, Monte M, Gomez-Sanchez C, Piwien-Pilipuk G. The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Mol Cell Biol*. 2010;30(5):1285–1298.
- Grossmann C, Ruhs S, Langenbruch L, et al. Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling. *Chem Biol*. 2012;19(6):742–751.
- Mollapour M, Neckers L. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(3):648–655.
- Yu X, Guo ZS, Marcu MG, et al. Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by decapeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(7):504–513.
- Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, et al. An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell*. 2007;25(1):151–159.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009;325(5942):834–840.
- Bali P, Prapat M, Bradner J, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: A novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem*. 2005;280(29):26729–26734.
- Nimmanapalli R, Fuino I, Bali P, et al. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells. *Cancer Res*. 2003;63(16):5126–5135.
- Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, et al. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell*. 2005;18(5):601–607.
- Zhang Y, Kwon S, Yamaguchi T, et al. Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol*. 2008;28(5):1688–1701.
- Ai J, Wang Y, Dar JA, et al. HDAC6 regulates androgen receptor hypersensitivity and nuclear localization via modulating Hsp90 acetylation in castration-resistant prostate cancer. *Mol Endocrinol*. 2009;23(12):1963–1972.
- Gibbs A, Schwartzman J, Deng V, Alumkal J. Sulforaphane destabilizes the androgen receptor in prostate cancer cells by inactivating histone deacetylase 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(39):16663–16668.
- Murphy PJ, Morishima Y, Kovacs JJ, Yao TP, Pratt WB. Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem*. 2005; 280(40):33792–33799.
- Espallergues J, Teegarden SL, Veerakumar A, et al. HDAC6 regulates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with critical impact on stress resilience. *J Neurosci*. 2012;32(13):4400–4416.
- Aguilar-Sánchez C, Hernández-Díaz I, Lorenzo-Díaz F, et al. Identification of permissive insertion sites for generating functional fluorescent mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*. 2012;153(7):3517–3525.
- Muller C, Cluzeaud F, Pinon GM, Rafestin-Oblin ME, Morfin R. Dehydroepiandrosterone and its 7-hydroxylated metabolites do not interfere with the transactivation and cellular trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;92(5):469–476.
- Valenzuela-Fernández A, Alvarez S, Gordon-Alonso M, Barrero M, et al. Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Mol Biol Cell*. 2005;16(11):5445–5454.
- Kimes BW, Brandt BL. Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res*. 1976;98(2):349–366.
- Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, et al. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2979–2984.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

143 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO Fecha: 16/02/2017 14:29:18

37. Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG, et al. Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology*. 2006;147(3):1343–1348.
38. Refolio E, Cavero S, Marcon E, Freire R, San-Segundo PA. The Ddc2/ATRIP checkpoint protein monitors meiotic recombination intermediates. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 14):2488–2500.
39. Walther RF, Atlas E, Carrigan A, et al. A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J Biol Chem*. 2005;280(17):17549–17561.
40. Gravez B, Tarjus A, Jimenez-Canino R, et al. The diuretic torasemide does not prevent aldosterone-mediated mineralocorticoid receptor activation in cardiomyocytes. *PLoS One*. 2013;8(9):e73737.
41. Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006;3(12):995–1000.
42. Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension*. 2012;59(5):966–972.
43. Boulkroun S, Fay M, Zennaro MC, Escoubet et al. Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene. *J Biol Chem*. 2002;277(35):31506–31515.
44. Sainte Marie Y, Toulon A, Paus R, et al. Targeted skin overexpression of the mineralocorticoid receptor in mice causes epidermal atrophy, premature skin barrier formation, eye abnormalities, and alopecia. *Am J Pathol*. 2007;171(3):846–860.
45. Gomez-Sanchez CE, Warden M, Gomez-Sanchez MT, Hou X, Gomez-Sanchez EP. Diverse immunostaining patterns of mineralocorticoid receptor monoclonal antibodies. *Steroids*. 2011;76(14):1541–1545.
46. Ou XM, Storrington JM, Kushwaha N, Albert PR. Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J Biol Chem*. 2001;276(17):14299–14307.
47. Fejes-Tóth G, Pearce D, Náráy-Fejes-Tóth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: Effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2973–2978.
48. Nishi M, Ogawa H, Ito T, Matsuda KI, Kawata M. Dynamic changes in subcellular localization of mineralocorticoid receptor in living cells: In comparison with glucocorticoid receptor using dual-color labeling with green fluorescent protein spectral variants. *Mol Endocrinol*. 2001;15(7):1077–1092.
49. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002;417(6887):455–458.
50. Faresse N, Ruffieux-Daidie D, Salamin M, Gomez-Sanchez CE, Staub O. Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(6):F1462–F1472.
51. Banerjee A, Periyasamy S, Wolf IM, et al. Control of glucocorticoid and progesterone receptor subcellular localization by the ligand-binding domain is mediated by distinct interactions with tetratricopeptide repeat proteins. *Biochemistry*. 2008;47(39):10471–10480.
52. Verrey F. Early aldosterone action: Toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1999;277(3 Pt 2):F319–F327.
53. Kadiyala V, Patrick NM, Mathieu W, et al. Class I lysine deacetylases facilitate glucocorticoid-induced transcription. *J Biol Chem*. 2013;288(40):28900–28912.
54. Lee HA, Lee DY, Cho HM, Kim SY, Iwasaki Y, Kim IK. Histone deacetylase inhibition attenuates transcriptional activity of mineralocorticoid receptor through its acetylation and prevents development of hypertension. *Circ Res*. 2013;112(7):1004–1012.
55. Kang SH, Seok YM, Song MJ, Lee HA, Kurz T, Kim I. Histone deacetylase inhibition attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis through acetylation of mineralocorticoid receptor in spontaneously hypertensive rats. *Mol Pharmacol*. 2015;87(5):782–791.
56. Seo M, Song M, Seok YM, et al. Lysine acetyltransferases cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein and acetyltransferase p300 attenuate transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor through its acetylation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(5):559–566.
57. Lee HA, Song MJ, Seok YM, Kang SH, Kim SY, Kim I. Histone deacetylase 3 and 4 complex stimulates the transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136801.
58. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev*. 2013;93(3):1139–1206.
59. Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280(2):F181–F192.
60. De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 1998;19(3):269–301.
61. Rezaei M, Andrieu T, Neuenschwander S, et al. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by microRNA. *Hypertension*. 2014;64(4):860–866.
62. Sadosky PW, Scammell JG. Increased production of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the kidney microsomes of squirrel monkeys (*Saimiri* spp.). *Comp Med*. 2008;58(2):180–187.
63. Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*. 1994;135(3):834–840.
64. Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, et al. Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(8):758–770.
65. Li Y, Shin D, Kwon SH. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS J*. 2013;280(3):775–793.
66. Libby PR. Histone acetylation and hormone action. Early effects of aldosterone on histone acetylation in rat kidney. *Biochem J*. 1973;134(4):907–912.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

144 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083


Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Phosphorylation of Mineralocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Impairs Receptor Activation and Has a Dominant Negative Effect over Non-phosphorylated Receptors*

Received for publication, January 29, 2016, and in revised form, July 12, 2016. Published, JBC Papers in Press, July 15, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.718395

Rubén Jiménez-Canino,¹ Miguel X. Fernandes, and  Diego Alvarez de la Rosa²

From the Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Instituto de Tecnologías Biomédicas y Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias (CIBICAN), Universidad de La Laguna, 38071 La Laguna, Tenerife, Spain

Post-translational modification of steroid receptors allows fine-tuning different properties of this family of proteins, including stability, activation, or interaction with co-regulators. Recently, a novel effect of phosphorylation on steroid receptor biology was described. Phosphorylation of human mineralocorticoid receptor (MR) on Ser-843, a residue placed on the ligand binding domain, lowers affinity for agonists, producing inhibition of gene transactivation. We now show that MR inhibition by phosphorylation occurs even at high agonist concentration, suggesting that phosphorylation may also impair coupling between ligand binding and receptor activation. Our results demonstrate that agonists are able to induce partial nuclear translocation of MR but fail to produce transactivation due at least in part to impaired co-activator recruitment. The inhibitory effect of phosphorylation on MR acts in a dominant-negative manner, effectively amplifying its functional effect on gene transactivation.

Steroid receptors (SRs)³ are part of the nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors that modulate gene transcription in response to changes in steroid hormone levels (1). SRs present a modular architecture, with three well defined domains: an NH₂-terminal activation domain (NTD), a central DNA binding domain, and a COOH-terminal ligand binding domain (LBD). Generally, the apo receptor resides in the cytosol forming a heterocomplex with other proteins including chaperones such as heat-shock protein 90 (Hsp90). Ligand binding alters SR conformation, releasing it from the complex and promoting translocation to the

nucleus, where it binds specific DNA sequences as a dimer and alters transcription of target genes by recruiting transcriptional co-regulators (2). Post-translational modifications, including phosphorylation, ubiquitylation, sumoylation, and acetylation, modulate SR stability and different steps on the activation pathway, including receptor dimerization, DNA binding, and interaction with co-regulators (3).

Until recently, it was widely assumed that SR ligand affinity is an intrinsic property defined by the structure of the LBD and not subject to modulation by post-translational modifications. However, Shibata *et al.* (4) have shown that regulated phosphorylation of Ser-843 in the LBD of human mineralocorticoid receptor (MR), a canonical member of the SR subfamily of nuclear receptors, impairs its ability to mediate gene transactivation by lowering ligand affinity. MR is closely related to the glucocorticoid receptor (GR) and can be activated under physiological conditions by mineralocorticoids such as aldosterone and glucocorticoids such as cortisol or corticosterone. MR has a wide variety of physiological and pathophysiological functions, with a prominent role in regulating transepithelial ion and fluid transport, which is essential for extracellular volume homeostasis and, therefore, blood pressure control. Phosphorylation of MR Ser-843 is restricted to intercalated cells of the distal nephron, where it has a physiological role in controlling the differential activation of MR by aldosterone under two different physiological conditions (volume depletion *versus* hyperkalemia) (4).

Working with an MR phosphomimetic mutant, Shibata *et al.* (4) showed that Ser-843 phosphorylation results in the loss of ligand-induced nuclear translocation at physiological concentrations of aldosterone (1 nM) and, consequently, a loss of gene transactivation. Ligand binding affinity is decreased by 2 orders of magnitude (K_d for [³H]aldosterone changed from 0.64 nM in the wild-type receptor to 86 nM in mutant S843E) (4). Structural modeling of the LBD suggested that phosphorylation of residue Ser-843 may affect the interaction between helices H6 and H7 in the ligand-bound state.

Based on these results, we set out to answer two different but related questions. 1) Does the phosphorylation of Ser-843 result only in decreased binding affinity or does it also affect coupling between ligand binding and receptor activation? 2) How does the proportion of phosphorylated *versus* non-phosphorylated MR affect receptor function? Our results demon-

* This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (Spain) Grant BFU2013-47089-R, European Cooperation on Science and Technology (COST) network ADMIRE BM1301, and the European Union Seventh Framework Program "Capacities" (FP7-REGPOT-2012-CT2012-31637-IMBRAIN). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ Supported by predoctoral fellowships from Cajacanarias (Spain) and Formación de Profesorado Universitario (FPU) Program (Ministerio de Educación, Spain).

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-922-319-968; Fax: 34-922-319-397; E-mail: diego.alvarez@ull.edu.es.

³ The abbreviations used are: SR, steroid receptor; GR, glucocorticoid receptor; Hsp90, heat-shock protein 90; LBD, ligand-binding domain; MR, mineralocorticoid receptor; NTD, NH₂-terminal domain; PLA, proximity ligation assay; SRC-1, steroid receptor co-activator 1; YFP, yellow fluorescent protein.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

strate that agonists at high concentrations are able to induce near-complete nuclear translocation of phosphomimetic mutant receptors, albeit at a much slower rate, but are ineffective in inducing agonist-dependent gene transactivation. This suggests altered coupling between ligand binding and receptor activation, resulting in impaired interaction with co-regulators. Moreover, phosphomimetic MR mutants have a dominant negative effect on WT receptor function, a feature that will amplify the physiological effect of LBD phosphorylation.

Results

This study used a previously described fluorescent derivative of mouse wild-type MR with insertion of yellow fluorescent protein (YFP) after amino acid 147 of the MR sequence (5). This construct is indistinguishable from the wild-type mouse receptor in hormone-induced nuclear translocation, apparent affinity for ligand-induced gene transactivation, DNA binding, and regulation of non-genomic pathways (5). The construct, originally named MR-YFP-147 but referred to as MR-WT in this study, was the basis to introduce phosphomimetic mutants S839D and S839E (mouse Ser-839 is the equivalent of human MR S843). To ensure that these constructs display the expected affinities for aldosterone and are comparable with those described by Shibata *et al.* (4) using human MR, we calculated equilibrium dissociation constants (K_d) with competitive binding assay in transfected COS-7 cells (Fig. 1). Results showed a K_d of 1.07 nM for fluorescent MR-WT, which is in the expected range for a wild-type receptor (K_d 0.5–2 nM; Ref. 6). Phosphomimetic mutants S839D and S839E presented decreased affinity for aldosterone, with K_d values of 86.7 and 34.3 nM, respectively, which are in the same range of the K_d value described for the equivalent mutation S843E in the human MR clone.

We then asked whether phosphorylation of MR at residue 843 impairs receptor activity exclusively by lowering ligand affinity or whether it also uncouples ligand binding from receptor activation. If the first option is correct, increasing aldosterone concentration should result in normal nuclear translocation and gene transactivation. To test this hypothesis we studied aldosterone-induced nuclear translocation using our fluorescent derivative of wild-type mouse MR (MR-WT) and compared it with the same receptor harboring phosphomimetic mutations. COS-7 cells transfected with WT, S839E, or S839D MR were left untreated or exposed overnight to increasing concentrations of aldosterone (0.1–100 nM) covering a range of physiological (0.1–2 nM) to supra-physiological levels. In the absence of ligand the vast majority of cells showed a predominantly cytosolic MR localization (Fig. 2, A and C) as previously described (7, 8). Mutations S839D or S839E did not change naive MR subcellular localization (Fig. 2, A and C). When cells were stimulated overnight with increasing concentrations of aldosterone, MR-WT translocated to the nucleus, with >90% of the cells showing an exclusive MR nuclear localization with as little as 1 nM aldosterone (Fig. 2, A and C). In comparison, aldosterone partially translocated mutants MR-S839D and MR-S839E. The effect started to be apparent at 1 nM aldosterone and continued growing with up to 100 nM aldosterone, where ~90% of cells showed a predominantly nuclear localization (Fig. 2, B and C). These results suggests that

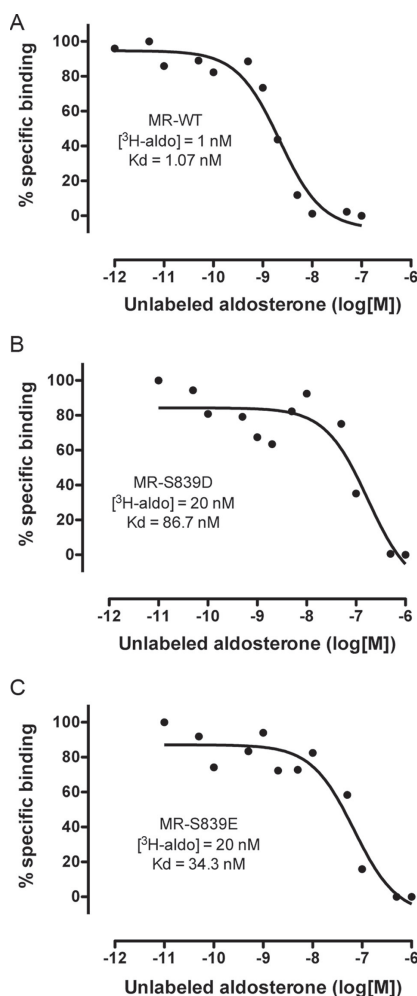


FIGURE 1. Phosphomimicking mutants MR-S839D and MR-S839E show decreased affinity for aldosterone. COS-7 cells were transfected with WT or mutant MR and the binding affinity for $[^3\text{H}]$ aldosterone (aldo) was measured using a competitive binding assay. Cells were treated with a fixed concentration of $[^3\text{H}]$ aldosterone (1 nM for WT and 20 nM for mutant MR) in the presence of increasing concentrations of unlabeled aldosterone. A, wild-type MR (MR-WT). B, MR mutant S839D (MR-S839D). C, MR mutant S839E (MR-S839E). Data points are an average of duplicate measurements and represent normalized specific binding. Calculated K_d values are indicated for each plot.

phosphorylation of MR impairs nuclear translocation but only to a limited extent, with a significant amount of receptor present in the nucleus.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

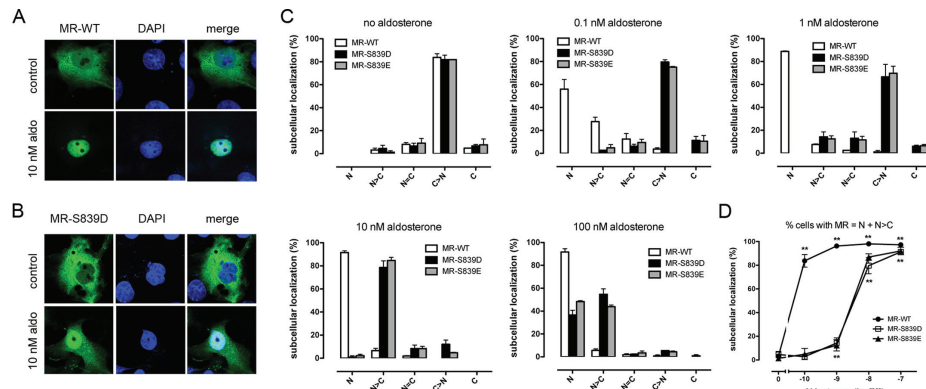


FIGURE 2. Phosphomimetic mutants MR-S839D and MR-S839E show partial ligand-induced nuclear translocation. *A*, representative images of YFP-tagged wild-type MR (WT) subcellular localization in COS-7 cells in the absence of ligand or after overnight treatment with 10 nM aldosterone. *B*, representative images of YFP-tagged MR-S839D subcellular localization in COS-7 cells in the absence of ligand or after overnight treatment with 10 nM aldosterone. *C*, quantitative analysis of MR-WT, MR-S839D, and MR-S839E subcellular localization in the absence of ligand or after 16 h stimulation with the indicated concentrations of aldosterone. Cells were scored into five different categories reflecting the localization of MR (*C*, exclusively cytosolic; *C* > *N* predominantly cytosolic; *C* = *N* evenly distributed between nucleus and cytosol; *C* < *N*, predominantly nuclear; *N*, exclusively nuclear). Bars represent the average percentage of cells \pm S.E. scored under each category ($n = 3$ independent experiment, with at least 75 cells scored in each group and experiment). No significant differences between mutants S839D and S839E were detected in any of the conditions tested (unpaired *t* test). *D*, plot summarizing the average percentage of cells with either predominantly nuclear ($C < N$) or exclusively nuclear (*N*) MR localization for each of the three constructs (WT, S839D, and S839E). Note that the x axis has been split in two segments to be able to represent data from untreated (no aldosterone) cells next to the treated cells in a log scale. **, $p < 0.01$ compared with control (no aldosterone) condition, one-way analysis of variance, followed by Dunnett's multiple comparison test.

To test whether decreased nuclear localization induced by phosphorylation arises from slower nuclear import, we examined the kinetics of this process in COS-7 cells transfected with MR-WT or phosphomimetic mutation S839D (both tagged with YFP). To that end, living cells were placed under a confocal microscope in a temperature-controlled chamber at 37 °C and stimulated with 10 nM aldosterone. Images of the same cells were taken every 2 min for up to 60 min after the addition of the hormone, and the proportion of nuclear receptor was calculated in every cell for each time point. Representative images of WT and S839D MR translocation are shown in Fig. 3*A*. When compared with the WT receptor, mutant S839D showed very slow translocation kinetics, with <20% of the cytosolic receptor translocated over the period of 1 h (Fig. 3, *A* and *B*). This strongly suggests that impaired ligand-induced nuclear accumulation of the phosphomimetic MR mutant arises from slower nuclear import. This in turn may arise from lower affinity for the ligand but could also imply either decreased stability of aldosterone in the LBD or a defect in coupling ligand binding with receptor conformational change.

We then tested the functional consequences of mutating mouse MR residue Ser-839 for MR-mediated gene transactivation. We tested non-phosphorylatable mutant S839A and phosphomimicking mutants S839D and S839E. Aldosterone dose-response luciferase reporter assays showed an EC_{50} of 0.4 nM for MR WT, whereas S839A EC_{50} was 2.8 nM. Upon stimulation with cortisol, WT MR displayed an EC_{50} of 9.8 nM, and MR-S839A had an EC_{50} of 19.3. As described with human MR-S843E, mouse MR-S839E and mouse MR-S839D did not

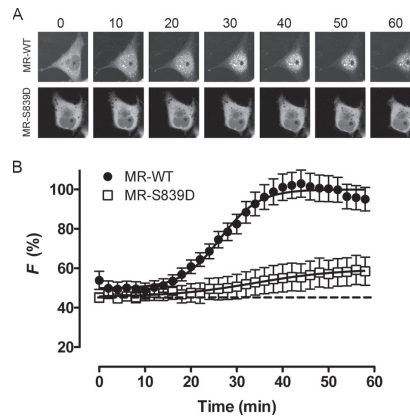


FIGURE 3. MR-S839D shows a drastically reduced ligand-induced nuclear translocation rate. *A*, representative images of cells transfected with YFP-tagged wild-type MR (MR-WT) or mutant S839D (MR-S839D) and examined under confocal microscopy at 37 °C to detect nuclear translocation induced by 10 nM aldosterone. Numbers refer to time after the addition of aldosterone (min). *B*, quantitative analysis of MR-WT or MR-S839D nuclear translocation. Individual points represent average \pm S.E. ($n = 9$) percentage nuclear fluorescence intensity versus total cellular fluorescence (*F*). Images taken once every 2 min after the addition of 10 nM aldosterone, up to 60 min. Data points were fitted to Boltzmann sigmoid curves. The dashed line indicates the basal level of percentage nuclear localization.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

display aldosterone or cortisol-dependent gene transactivation even at high doses of ligand (Fig. 4, A and B). Western blotting analysis showed that the lack of MR-S839D or MR-S839E transactivation and reduced MR-S839A transactivation were not due to impaired protein expression (Fig. 4C).

The lack of any gene transactivation by MR-S839E or MR-S839D at ligand concentrations where there is significant nuclear translocation in the same time frame (compare Fig. 2 and Fig. 4) supports the idea that phosphorylation of MR LBD not only lowers MR affinity for agonists but has a profound impact on the ability of the ligand to activate the receptor. Therefore, we hypothesized that the phosphomimetic mutant may prevent efficient interaction with co-regulators. To investigate this possibility we tested ligand-induced MR interaction with a well known co-activator, steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) (9–11). SRC-1 displays a predominantly nuclear localization both in control and aldosterone-stimulated conditions, whereas MR shows the expected ligand-induced trafficking from cytosol to nucleus (Fig. 5A). To quantitatively assess MR-SRC-1 interaction, we used a proximity ligation assay (PLA). Co-transfection of MR-WT and SRC-1 resulted in a prominent PLA signal in the cell nucleus only in the presence of aldosterone (Fig. 5B). Omission of either one of the transfected plasmids resulted in the absence of signal (Fig. 5, B and C). Quantitative analysis demonstrated that PLA signal was drastically reduced (to ~15% of the WT signal) when the phosphomimetic mutants MR-S839D or MR-S839E were co-transfected with SRC-1 (Fig. 5, B and C).

Based on MR LBD crystal structure, Shibata *et al.* (4) predicted that phosphorylation of residue Ser-843 could affect ligand binding and/or receptor activation. Indeed, their experimental measurements of WT and phosphomimetic mutant S843E K_d for aldosterone showed decreased affinity (from 0.63 nM to 86 nM) (4). To further investigate the possible effects of phosphorylation at Ser-843, we modeled this post-translational modification using available crystal structures of MR LBD as templates (12). Using this model we performed docking calculations to estimate the energy of interaction of aldosterone, cortisol, and spironolactone to MR LBD in the WT form with phosphorylated Ser-843 or introducing phosphomimetic mutation S843D (Table 1). To validate docking parameterization, we compared the position of aldosterone as calculated by docking with the position of aldosterone as determined by x-ray crystallography. Both were practically superimposable (not shown). Docking interaction energy for aldosterone was only slightly affected by phospho-Ser-843, S843D or S839E modifications (Table 1), suggesting that the decreased affinity observed by Shibata *et al.* (4) may have a kinetic basis rather than a change in equilibrium interaction. Given that intercalated cells, where Ser-843 phosphorylation has been described, lack 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 2 and its MR may, therefore, be activated by cortisol (4, 13), we also calculated docking energy for this hormone. In contrast to aldosterone, cortisol appears to bind slightly more stably to the modified LBD (Table 1), again suggesting that the absence of cortisol transactivation of phosphomimetic mutants observed previously (4) and confirmed here (Fig. 4B) does not arise from impaired equilibrium interaction with MR LBD. Spironolac-

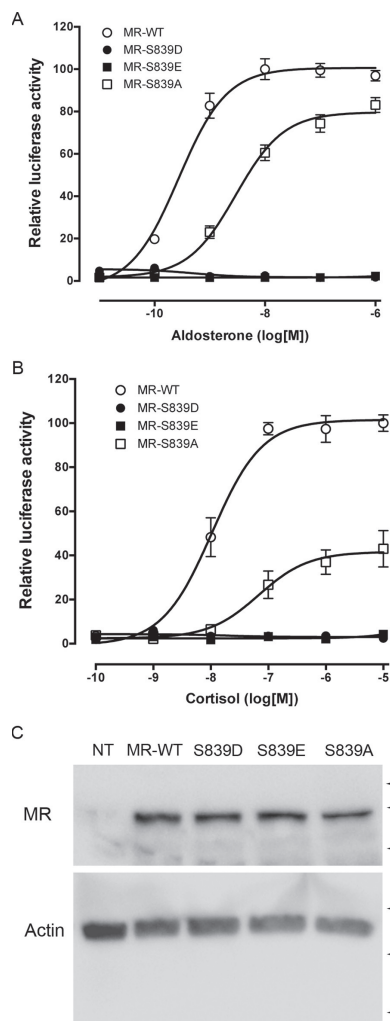


FIGURE 4. MR-S839D and MR-S839E mutants are unable to mediate ligand-induced gene transactivation. Aldosterone (A) and cortisol (B) dose-response gene transactivation curves corresponding to WT MR, or mutants MR-S843D, MR-S839E, and MR-S843A. Individual points represent the average \pm S.E. ($n = 3$) firefly/*Renilla* values normalized to the maximum activity in each construct. Data points were fitted to a variable slope model (four parameters). C, Western blotting analysis of WT and mutant MR expression in COS-7 cells. NT, non transfected cells. The same blot was consecutively probed with anti-MR and anti- β -actin antibodies. Arrowheads mark the migration of molecular mass markers (values in kDa).

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

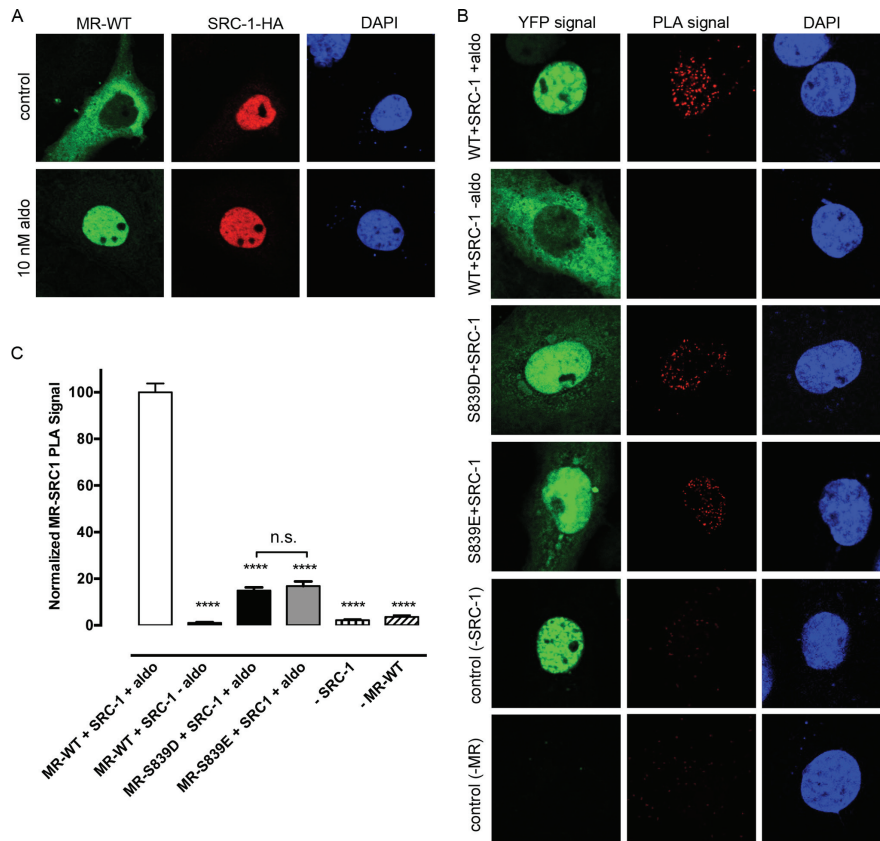


FIGURE 5. Phosphomimetic mutants MR-S839D and MR-S839E impair interaction with co-activator SRC-1 after aldosterone treatment. A, subcellular distribution of YFP-tagged wild-type MR (MR-WT) and HA-tagged SRC-1 transfected in COS-7 cells and treated or not with 10 nM aldosterone (*aldo*) for 24 h. B, representative images of proximity ligation assay results examining the interaction of MR with SRC-1. C, quantitative analysis of MR-SRC-1 interaction when WT or mutant MR were co-transfected with SRC-1 and treated with 10 nM aldosterone. Bars represent the average number of puncta/cell \pm S.E. ($n = 36-40$ cells per condition). Negative controls consisted on the omission of aldosterone treatment (*-aldo*) or leaving out either MR (*-MR-WT*) or SRC-1 (*-SRC-1*) from the transfection mix. ****, $p < 0.0001$; n.s., no significant difference when compared with MR-WT+aldo condition; Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test.

TABLE 1
Docking interaction energies (kcal mol^{-1}) of ligands with modeled MR WT, mutant, or phosphorylated ligand binding domain
Calculations assume an error of $\pm 0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$.

MR LBD variant	Aldosterone	Cortisol	Spirolactone
Ser-843	-11.3	-9.9	-13.2
S843D	-10.8	-10.8	-12.2
S843E	-11.3	-11.2	-13.5
Ser(P)-843	-10.8	-10.6	-12.3

tone showed a decrease in docking energy interaction with Ser-843 phosphorylation and S843D mutation but not with S843E mutation (Table 1). Interestingly, interaction energies for the

three ligands were almost identical in the model incorporating a phosphorylation of Ser-843 when compared with mutation S843D (Table 1) but not compared with mutation S843E, suggesting that using phosphomimetic mutation S843D may be a better approximation to study the effects of Ser-843 phosphorylation in MR function.

To investigate the functional impact of partial MR phosphorylation we co-expressed different proportions of WT and S843D receptors in COS-7 cells. To ensure that the different proportions of plasmids produced the desired protein expression levels, we performed Western blotting analysis of receptor expression. Both receptors were recognized by the same

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

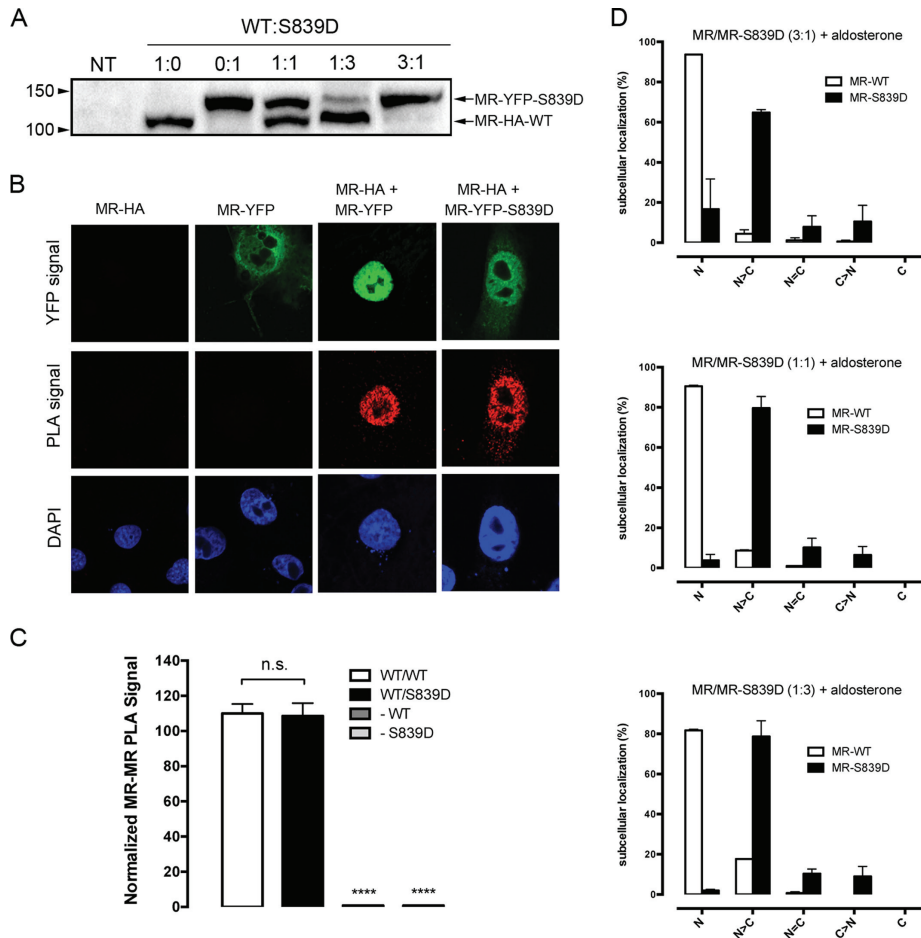


FIGURE 6. MR-WT and MR-S839D dimerize normally and show partial nuclear translocation. **A**, Western blotting analysis of HA-tagged wild-type MR (MR-HA-WT) and YFP-tagged MR S839D mutant (MR-YFP-S839D) protein levels after transfection of coding plasmid in the indicated proportions (WT:S839D). NT, non transfected cells. To differentiate between WT and mutant proteins a construct containing YFP and mutation S839D was used. Arrowheads indicate the migration of molecular mass markers (values in kDa). **B**, representative images of proximity ligation assays showing equal level of MR dimerization in the absence or presence of S839D mutation. **C**, quantitative analysis of MR-HA-WT interaction when MR-YFP-WT or mutant MR-YFP-S839D in cells treated with 10 nM aldosterone. Negative controls consisted on the omission of either the MR-HA-WT (-WT) or the MR-YFP-S839D (-S839D) plasmids in the co-transfection. Bars represent the average number of puncta/cell \pm S.E. ($n = 35-45$ cells per condition; n.s., no significant difference; ****, $p < 0.0001$; Student's *t* test). **D**, quantitative analysis of wild-type and S839D MR subcellular localization co-expressed in different proportions (3:1; 1:1, or 1:3) and stimulated with 10 nM aldosterone for 16 h.

anti-MR antibody but could be differentiated due to their different molecular weight produced by fusing YFP to MR-S839D. Co-expression of both receptors using 1:3, 1:1, and 3:1 plasmid proportions gave the expected ratios between WT and mutant MR (Fig. 6A). To confirm that S843D mutation does not disrupt

dimerization and it is able to form dimers with WT MR, we used PLA (Fig. 6B). Quantification of PLA results showed that MR dimerization was identical in the absence or presence of the S839D mutation (Fig. 6C). This result indicates that WT MR subunits do not discriminate between WT and S839D-contain-

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003		
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion		
Identificador del documento: 858046		Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 14/02/2017 15:54:28	
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO		
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	15/02/2017 15:41:59	
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ		
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	15/02/2017 21:26:03	
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ		

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

TABLE 2

Expected subunit composition of wild type and S839D heterodimers
Probabilities of different dimers are shown below for each possible plasmid combination, expressed in percentage. Assuming that both plasmids are processed equally to produce protein and that dimerization is not affected by S839D mutation, it is expected that the probability of heterodimer composition follows a binomial distribution given by the expression $p_i = P_{WT}^i P_{S839D}^{2-i}$, where p_i is the probability of i (0, 1, or 2) wild type subunits in a dimer ($n = 2$), and P_{WT} and P_{S839D} are the probabilities of encountering a wild type or S839D mutant in the total protein pool depending on the proportions of plasmids transfected.

Transfected proportions	Type of dimer formed		
	WT-WT	WT-S839D	S839D-S839D
3:1	56.25%	37.5%	6.25%
1:1	25	50	25
1:3	6.25%	37.5%	56.25%

ing subunits for dimerization. Therefore, we predicted that the distribution of WT-WT, WT-S839D, and S839D-S839D dimers when different proportions of WT MR and S839D mutant are co-transfected should follow a binomial distribution (calculated abundances of each type of dimer are shown in Table 2). We next investigated subcellular localization of three different conditions where WT-S839D proportions were variable (Fig. 6D). Subcellular distribution in the absence of ligand did not show any variation, as predicted by experiments transfecting each variant individually (shown in Fig. 1B). Subcellular localization of WT and S839D proteins in the presence of 10 nM aldosterone varied consistently with partially impaired nuclear localization of the S839D mutant (Fig. 6D and Table 3). Transactivation levels corresponded closely with the predicted amounts of WT homodimers (Fig. 7 and Table 2), indicating that heterodimers between WT and phosphomimetic S839D MR are transcriptionally inactive (Fig. 7). These results demonstrate that phosphorylation at residue Ser-839 has a dominant negative effect on MR activity.

It has previously been described that MR is able to heterodimerize with GR and affect its function. Using COS-7 cells as an expression model, Liu *et al.* (14) demonstrated that co-expression of MR diminishes GR-dependent transactivation, likely due to weak transcriptional activity of heterodimers. To test whether phosphorylation of MR residue Ser-839 affects GR activity, we co-transfected COS-7 cells with GR, WT MR, or phosphomimicking mutant MR-S839D and assessed dose dependence of cortisol-induced transactivation. MR and GR co-expression at a 1:1 ratio decreased luciferase induction by 50% at saturating cortisol concentrations when compared with GR expressed alone (Fig. 8A), consistent with previously published data (14). When GR was co-expressed with MR-S839D at a 1:1 ratio luciferase, transactivation further decreased to 25% that of maximum activity achieved when GR was expressed alone (Fig. 8A). The effect of MR-S839D co-expression on cortisol-induced MR activity was the same as the one detected with aldosterone (Fig. 8B). These observations are consistent with a model where MR-GR heterodimers possess very low or null transactivation capacity, with most of the detected cortisol-induced transactivation being conducted by GR-GR and MR-MR heterodimers. Because phosphorylated MR is inactive and acts as dominant negative toward non-phosphorylated MR, this post-translational modification would only further decrease cortisol-mediated gene transactivation in cells co-expressing MR and GR.

TABLE 3

Subcellular localization of MR and MR-S839D co-expressed in COS-7 cells at different proportions and stimulated with 10 nM aldosterone for 16 h

Values express average percentage of cells in each category as obtained in the experiments shown in Fig. 6C. Rows corresponding to unmixing conditions (only one plasmid transfected) contain dashes to indicate the missing MR form (WT or S839D mutant).

MR-MR-S839D ^a	N		N > C		N + N > C ^b	
	WT	S839D	WT	S839D	WT	S839D
1:0	91.5	—	6.6	—	98.1	—
0:1	—	1.0	—	78.6	—	79.6
3:1	93.7	16.7	4.4	64.8	98.1	81.5
1:1	90.4	3.8	8.6	79.6	99.1	83.4
1:3	81.7	1.9	17.6	78.7	99.3	80.6

^a Proportions of transfected plasmids.

^b Values obtained by adding the percentage of cells in N and N > C categories.

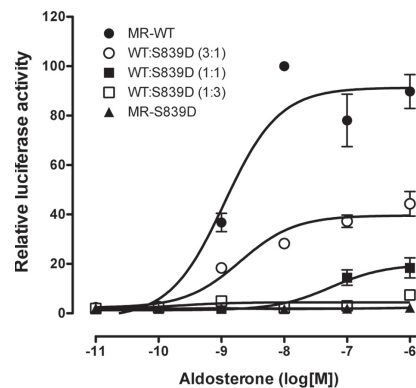


FIGURE 7. Phosphomimetic mutant MR-S839D displays dominant-negative activity over wild-type MR. The plot represents aldosterone-dependent reporter transactivation obtained after co-expression of wild-type and S839D MR in the indicated proportions. Individual points represent the average \pm S.E. ($n = 3$) firefly/Renilla values normalized to the maximum activity in each construct. Data points were fitted to a variable slope model (four parameters).

Discussion

Our results show that physiological and supra-physiological doses of aldosterone are able to induce at least partial translocation of phosphomimetic mutants MR-S839D and S839E, but the mutants are totally impaired for gene transactivation. This correlates with an inability to recruit a common MR co-activator, SRC-1. *In silico* modeling of the effect of Ser-839 phosphorylation on ligand docking energy suggests that this modification displays minor effects on steady-state ligand interaction. When co-expressed with WT receptor, MR-S839D decreased gene transactivation to an extent consistent with a dominant negative role in the SR dimer, consistent with a model where only one phosphorylated unit in the dimer will completely impair MR activity. Finally, our data suggest that MR phosphorylation at residue S839D will further impact cortisol-induced gene transactivation in cells co-expressing MR and GR.

Based on the previous work by Shibata *et al.* (4) and the data presented in this work, we can clearly see how there is good agreement between WT receptor K_d (1.07 nM) and EC_{50} (0.4 nM) for aldosterone. In contrast, there is a large difference when

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

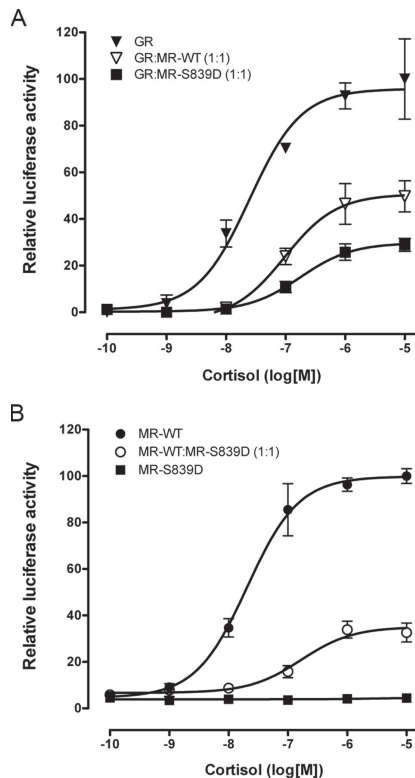


FIGURE 8. Expression of phosphomimetic mutant MR-S839D lowers cortisol-induced gene transactivation when MR and GR are co-expressed in the same cell. A, Cortisol-dependent reporter transactivation obtained after co-expression of wild-type or S839D MR with wild-type GR in the indicated proportions. B, Cortisol-dependent reporter transactivation obtained with wild-type MR, MR-S839D, or after co-expression of wild-type and mutant receptors. Individual points represent the average \pm S.E. ($n = 3$) firefly/Renilla values normalized to the maximum activity. Data points were fitted to a variable slope model (four parameters).

phosphomimetic mutants S839D or S839E (Ser-843 in the human sequence) are examined, with a K_d of 86.7 and 34.3 nM, respectively, but no gene transactivation detectable, even at 1 μ M aldosterone (see Fig. 4A). This discrepancy between K_d and EC_{50} is reminiscent of MR activation by cortisol. K_d for cortisol and aldosterone are in the same order of magnitude (0.5–2 nM), but EC_{50} for cortisol is 10 nM (for review see Ref. 6). The discrepancy between K_d and EC_{50} for cortisol-induced MR activation has been explained by the fast off-rate of cortisol from the complex (15–17). If this applies to the case of MR-Ser-839 phosphorylation, then one would expect to see a decreased nuclear translocation rate along with decreased apparent affinity for aldosterone-induced transactivation. Shibata *et al.* (4) found no

aldosterone-induced translocation of the phosphomimetic mutant, but they used a physiological dose of 1 nM aldosterone. In our experiments we could demonstrate partial translocation of the mutant receptor, with an increasing proportion of nuclear receptor following a dose-response relationship with aldosterone concentration (Fig. 2D). Surprisingly, no transactivation was detected, even at a high dose of aldosterone. Kino *et al.* (18) found that cyclin-dependent kinase 5-mediated neuronal MR phosphorylation at residues Ser-128, Ser-250, and Thr-159 (all placed in the NTD) dramatically interferes with MR activity but not with ligand-dependent nuclear accumulation. The authors interpreted this effect as a phosphorylation-dependent block of co-regulator interaction with the NTD without affecting hormone binding and receptor transformation associated to translocation. In the case of MR phosphorylation at Ser-839, it appears that, in addition to reduced agonist affinity, ligand binding-induced conformational changes are sufficient for nuclear translocation (even though it is performed at a much lower rate). However, ligand binding is clearly unable to support appropriate co-activator recruitment and gene transactivation, suggesting that the conformational change is either incorrect or unstable. This idea is further supported by recent work by Mani *et al.* (19) showing that mutation of human MR residue Ser-843 to proline (the amino acid present in the equivalent position in GR) does not affect MR affinity for aldosterone or cortisol but dramatically increases gene transactivation EC_{50} , suggesting an important role for this residue on receptor activation.

The above model is supported by our *in silico* analysis. Docking calculations of steady-state energy of interaction show that ligand binding is not greatly altered (in the case of cortisol, it is even more stable with the phosphorylated LBD), although an additional effect on ligand access to the binding pocket cannot be excluded. The fact that agonist binding was able to induce nuclear translocation suggests that MR LBD phosphorylation at residue Ser-839 may alter LBD conformational dynamics so that LBD-co-regulator protein-protein interaction interphase is altered (11, 16, 20).

The lack of transactivation function in mutants S839D and S839E made us wonder what would be the functional consequence of dimer formation between WT and phosphomimetic mutant receptors. Shibata *et al.* (4) showed that cells co-expressing wild-type MR and MR-S843E and treated with 1 nM aldosterone for 1 h display full wild-type MR translocation and no MR-S843E translocation. Therefore, the authors proposed that loss of aldosterone binding and lack of subsequent nuclear translocation produces the loss of gene transactivation. However, to explain the nuclear translocation data, one must assume that WT MR and MR-S843E do not dimerize and, therefore, act independently of one another. We examined this question in detail by co-transfecting MR WT and S839D mutant. Western blotting and PLA data (Fig. 6) demonstrate that both receptors were expressed in the expected proportions and, most importantly, that they appeared to dimerize freely. This is not surprising as the main determinant of receptor dimerization is the DNA binding domain, not the LBD (14). Under these conditions, the effect of S839D on aldosterone-induced MR activity fitted perfectly with a model where only

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

WT-WT dimers are active, strongly suggesting that heterodimers of phosphorylated and non-phosphorylated MR would be functionally inactive. This may be explained by both units in the dimer adopting a productive conformation to be able to simultaneously recruit co-regulators. Given that MR-S839D shows impaired interaction with co-activator SRC-1, it could be the case that asymmetrical recruitment of co-activators by only one unit in the dimer (the WT one) is not sufficient to promote gene transactivation. A very important consequence of this fact is that at physiological levels of circulating aldosterone, which are in the low nM range, 50% of phosphorylated receptor would totally prevent aldosterone-dependent gene transactivation (see Fig. 6D). In addition, the effect of MR on decreasing GR activity (14) combined with MR phosphorylation at residue Ser-839 would imply a highly reduced cortisol-mediated gene transactivation in cells that co-express MR and GR.

In summary, we have shown that inactivation of an SR by phosphorylation in the LBD most likely arises from an uncoupling between ligand binding and receptor conformational changes, partially impairing nuclear translocation but mainly interfering with co-activator recruiting. The physiological effect of this post-translational modification will likely be amplified by the fact that it acts in a dominant-negative fashion when modified and unmodified receptors dimerize.

Experimental Procedures

Plasmid Constructs

Generation and use of a functional fluorescent derivative of MR with insertion of YFP after amino acid 147 has been previously described (5, 21). A derivative of that construct substituting YFP by three copies of the HA epitope was generated by using *AscI* sites flanking the YFP sequence and cloning a PCR-generated 3×HA epitope with the same flanking sites. Mouse MR phosphomimetic mutations S839D and S839E and non-phosphorylatable mutation S839A (mouse MR Ser-839 is the equivalent residue to human Ser-843) were generated using the QuikChange Lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent) following the manufacturer's instructions. Plasmid expressing wild-type GR cloned in pcDNA3 (Invitrogen) has been described previously (15) and was a kind gift from Dr. Nicolette Farman (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris). Plasmid pcDNA3.1-SRC-1-HA, expressing SRC-1 tagged with an HA epitope, was produced by amplifying SRC-1 by PCR from mouse hippocampus cDNA using a proofreading DNA polymerase and a reverse oligonucleotide containing the coding sequence of the HA tag followed by cloning into pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector (pcDNA3.1 Directional TOPO® Expression kit, Thermo Fischer Scientific). All constructs and mutations were corroborated by DNA sequencing.

Cell Culture, Transfection, and Hormone Treatments

To study MR cellular dynamics and transactivation function we used COS-7 cells, which lack endogenous MR and GR expression (22). COS-7 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were transfected with Jetprime (Polyplus Transfection, Illkirch, France) following the manufacturer's instructions. When indicated, cells were

washed twice with DMEM medium and then transferred to medium supplemented with charcoal-stripped serum (Lonza, Barcelona, Spain) 24 h before the experiment started. Aldosterone and cortisol were obtained from Sigma, dissolved in ethanol, and added to cells to the final concentration indicated for each experiment. Control cells were treated with ethanol at the same dilution used for treatments (1:1000).

Western Blotting Analysis

MR protein expression was analyzed by Western blotting as previously described (7). Anti-MR 1D5 monoclonal antibody developed by Gomez-Sanchez *et al.* (23) was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD, National Institutes of Health and maintained at The University of Iowa Department of Biology. Rabbit polyclonal anti-GFP antibody was the kind gift of Dr. Raimundo Freire (Hospital Universitario de Canarias, Spain) and has been previously described (24). HA-tagged proteins were detected using a commercially available monoclonal antibody (clone HA.11, Covance, catalogue number MMS-101R, Madrid, Spain). Anti-mouse or anti-rabbit peroxidase conjugates (GE Healthcare) were used at 1:10,000 dilution. Western blots were developed with Immuno-Star WesternC kit (Bio-Rad), and signals were detected with a Chemidoc imaging system (Bio-Rad).

Competitive Binding Assay

Receptor binding affinity for aldosterone was determined in intact cells using a competitive binding assay essentially as described (19). Briefly, transfected cells were incubated for 1 h in serum-free medium and then treated with [³H]aldosterone (PerkinElmer Life Sciences; 1 nM for wild-type MR or 20 nM for S839D and S839E mutants) for 2 h at 37 °C in the presence of increasing concentrations of unlabeled aldosterone. Bound aldosterone was extracted with 80% ethanol, and radioactivity was measured by liquid scintillation. Specific binding was calculated by subtracting disintegrations per minute (dpm) obtained in the presence of 10 μM unlabeled aldosterone. Half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were calculated using nonlinear regression using Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA). Equilibrium dissociation constants (K_d) were then calculated from the IC₅₀ using the Cheng-Prussoff equation (25) in Prism 5 and assuming that labeled and unlabeled aldosterone have identical affinities so that K_d and the inhibition constant (K_i) are the same.

Analysis of MR Subcellular Localization and Nuclear Translocation Dynamics

Semiquantitative analysis of subcellular distribution in the absence of aldosterone was performed as previously described (7, 8, 26). Briefly, cells were fixed, images were taken under a confocal microscope, and at least 75 cells per condition were scored into five categories (N, exclusive nuclear localization; N > C, predominant nuclear localization; N = C, even distribution throughout cytosol and nucleus; N < C, predominant cytosolic localization; C, exclusive cytosolic localization). Data are shown as the percentage of cells in each category from the total amount of cells scored. To detect MR-3×HA, cells were immunostained following previously published procedures (26) using a monoclonal antibody against the HA epitope (clone

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

HA.11, Covance) and goat anti-mouse secondary antibodies conjugated to Alexa fluor 594 (Invitrogen). Images were collected using a Fluoview 1000 confocal microscope (Olympus, Barcelona, Spain). Kinetic analysis of aldosterone-induced MR nuclear translocation was performed as previously described (21, 26). Briefly, cells were transfected with MR-YFP and grown for 48 h in DMEM supplemented with charcoal-stripped FBS. Cells were then transferred to extracellular saline (137 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4), placed under the confocal microscope in a temperature-controlled environmental chamber set at 37 °C, and treated by adding 10 nM aldosterone to the medium. Images were collected at a sampling rate of 1 every 2 min for 1 h. Quantitative analysis of MR-YFP distribution was performed frame-by-frame using the manufacturer's software (Olympus). Controls in the absence of aldosterone were performed to control for photobleaching of YFP. Data processing and sigmoid curve-fitting were performed using Prism 5 (GraphPad) according to Equation 1:

$$F = F_0 + \frac{F_{\max} - F_0}{1 + \exp\left(\frac{t_{1/2} - t}{V_n}\right)} \quad (\text{Eq. 1})$$

where F_0 is the initial nuclear fluorescence, F_{\max} is the maximal nuclear fluorescence reached, $t_{1/2}$ is the time (min) at which fluorescence is halfway between F_0 and F_{\max} , and V_n is a factor determining how steeply nuclear accumulation changes with time.

Analysis of MR Transactivation Function

Different proportions of WT and mutant MR were co-transfected with a plasmid containing firefly luciferase under the control of a synthetic promoter with two copies of the glucocorticoid/mineralocorticoid-responsive element (GRE2X; kindly provided by Dr. Rainer Lanz, Baylor College of Medicine, Houston, TX). Transfection efficiency was controlled by co-transfection of a plasmid encoding *Renilla* luciferase under a cytomegalovirus promoter (pSG5-ren, kindly provided by Dr. Fátima Gebauer, Center for Genomic Regulation, Barcelona, Spain). Firefly and *Renilla* luciferase activities were measured sequentially in cell lysates using a commercial kit (Dual-Glo; Promega, Madison, WI). EC₅₀ values were calculated from normalized data fitted to a log(agonist) versus response equation with variable slope using Prism 5.

Analysis of MR Dimerization and Interaction with Co-regulators by in Situ PLA

PLA was performed using a commercially available kit (Duolink, Olink Biosciences, Uppsala, Sweden) as recently described (26). To assess interaction of MR with co-regulators, COS-7 cells were transfected with MR-147-YFP and pcDNA3.1-SRC-1-HA. To study MR dimerization, MR-147-HA was co-transfected with MR-147-YFP or MR-147-YFP-S839D. The antibodies used in these assays were rabbit polyclonal anti-GFP antibody (a kind gift from Dr. Raimundo Freire) and mouse monoclonal anti-HA antibody (clone HA.11, Covance, Madrid, Spain) and were validated by immunocytochemistry using previously described procedures (5, 7). Negative controls consisted on omitting one of the transfected plasmids. When

indicated, cells were treated with 10 nM aldosterone overnight. Results were quantified using the software provided by the manufacturer (Duolink Image Tool) and are expressed as average number of puncta/cell area.

Structure Modeling and Ligand Docking

General—All calculations were performed on a Windows 7 PC with six core Intel i7-4930K processor (3.4GHz) with 16 gigabytes total RAM using Schrödinger's Biologics and Small-Molecule Drug Discovery suites of software programs (Schrödinger, LLC, New York).

Ligand Preparation—LigPrep was used to produce low energy three-dimensional conformations of all docked compounds, and Epik was used to generate their ionization/tautomeric states. The chiralities of the compounds were retained from the original state, and ligands conformations were minimized using OPLS-2005 force field.

Protein Preparation—The receptor ligand binding domain crystallographic structure was loaded from the Protein Data Bank (PDB) and prepared by using Protein Preparation Wizard. We used the structure with the PDB ID 3VHU (12). We assigned bond orders, added missing H atoms, and filled in the missing loops and the side chains using Prime. Water molecules beyond 5 Å from co-crystallized ligand were deleted, and ionization/tautomeric states were generated at pH 7.0 ± 2.0 using Epik. Afterward, the protein structures were refined by optimizing hydrogen bonds (H-bonds) and sampling water molecule orientations. At the end, a restrained minimization (<0.30 Å for each heavy atom) was performed using OPLS-2005 force field.

Ligand Docking—All the docking calculations were performed with Glide SP algorithm with the final scoring using the GlideScore. Docking grids were generated by Glide using the co-crystallized ligand at the center of the grid box. The compounds were docked flexibly, and after docking we kept the 20 best docked conformations for each pair ligand/receptor.

Receptor Modeling—Receptor variants of interest (the phosphomimetic and the phosphorylated ones) were generated using BioLuminate, which uses a rotamer library in Prime for side-chain sampling with a variable dielectric treatment of polarization from the protein side chains and an implicit solvent surface generalized born model with the OPLS-2005 force field for energy evaluations. The receptor variants were generated by sampling and refining all residues side chain and backbone atoms within 5 Å of the mutated residues using Prime side-chain prediction combined with backbone sampling.

Author Contributions—R. J.-C. conducted most of the experiments. R. J.-C. and D. A. R. analyzed the results and wrote most of the paper. M. X. F. conducted *in silico* simulations and contributed to analyzing and interpreting data and writing of the paper. D. A. R. conceived the idea for the project. All authors corrected and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments—We thank Dr. Nicolette Farman, Dr. Raimundo Freire, Dr. Fátima Gebauer, and Dr. Rainer Lanz for the kind gift of reagents.

SEPTEMBER 2, 2016 • VOLUME 291 • NUMBER 36

ASBMB

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 19077

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

154 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

154 / 212

Mechanism of MR Modulation by LBD Phosphorylation

References

- Sever, R., and Glass, C. K. (2013) Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a016709
- McKenna, N. J., and O'Malley, B. W. (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**, 465–474
- Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., and Rowan, B. G. (2012) Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl. Recept. Signal.* **10**, e001
- Shibata, S., Rinehart, J., Zhang, J., Moeckel, G., Castañeda-Bueno, M., Stiegler, A. L., Boggon, T. J., Gamba, G., and Lifton, R. P. (2013) Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell Metab.* **18**, 660–671
- Aguilar-Sánchez, C., Hernández-Díaz, I., Lorenzo-Díaz, F., Navarro, J. F., Hughes, T. E., Giraldez, T., and Alvarez de la Rosa, D. (2012) Identification of permissive insertion sites for generating functional fluorescent mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* **153**, 3517–3525
- Farman, N., and Rafestin-Oblin, M. E. (2001) Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**, F181–F192
- Hernández-Díaz, I., Giraldez, T., Arnau, M. R., Smits, V. A., Jaisser, F., Farman, N., and Alvarez de la Rosa, D. (2010) The mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive nuclear localization signals. *Endocrinology* **151**, 3888–3899
- Walther, R. F., Atlas, E., Carrigan, A., Rouleau, Y., Edgcombe, A., Visentin, L., Lamprecht, C., Addicks, G. C., Haché, R. J., and Lefebvre, Y. A. (2005) A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **280**, 17549–17561
- Amazit, L., Le Billan, F., Kolkhof, P., Lamribet, K., Viengchareun, S., Fay, M. R., Khan, J. A., Hillisch, A., Lombès, M., Rafestin-Oblin, M. E., and Fagart, J. (2015) Finerenone impedes aldosterone-dependent nuclear import of the mineralocorticoid receptor and prevents genomic recruitment of steroid receptor coactivator-1. *J. Biol. Chem.* **290**, 21876–21889
- Hultman, M. L., Krasnopero, N. V., Li, S., Du, S., Xia, C., Dietz, J. D., Lala, D. S., Welsch, D. J., and Hu, X. (2005) The ligand-dependent interaction of mineralocorticoid receptor with coactivator and corepressor peptides suggests multiple activation mechanisms. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1460–1473
- Li, Y., Suino, K., Daugherty, J., and Xu, H. E. (2005) Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell* **19**, 367–380
- Hasui, T., Matsunaga, N., Ora, T., Ohyabu, N., Nishigaki, N., Imura, Y., Igata, Y., Matsui, H., Motoyaji, T., Tanaka, T., Habuka, N., Sogabe, S., Ono, M., Siedem, C. S., Tang, T. P., Gauthier, C., De Meese, L. A., Boyd, S. A., and Fukumoto, S. (2011) Identification of benzoxazin-3-one derivatives as novel, potent, and selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **54**, 8616–8631
- Funder, J. W. (2013) Angiotensin retains sodium by dephosphorylating mineralocorticoid receptors in renal intercalated cells. *Cell Metab.* **18**, 609–610
- Liu, W., Wang, J., Sauter, N. K., and Pearce, D. (1995) Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 12480–12484
- Hellal-Levy, C., Couette, B., Fagart, J., Souque, A., Gomez-Sanchez, C., and Rafestin-Oblin, M. (1999) Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS Lett.* **464**, 9–13
- Hellal-Levy, C., Fagart, J., Souque, A., and Rafestin-Oblin, M. E. (2000) Mechanistic aspects of mineralocorticoid receptor activation. *Kidney Int.* **57**, 1250–1255
- Lombes, M., Kenouch, S., Souque, A., Farman, N., and Rafestin-Oblin, M. E. (1994) The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **135**, 834–840
- Kino, T., Jaffe, H., Amin, N. D., Chakrabarti, M., Zheng, Y. L., Chrousos, G. P., and Pant, H. C. (2010) Cyclin-dependent kinase 5 modulates the transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor and regulates expression of brain-derived neurotrophic factor. *Mol. Endocrinol.* **24**, 941–952
- Mani, O., Nashev, L. G., Livelov, C., Baker, M. E., and Odermatt, A. (2016) Role of Pro-637 and Gln-642 in human glucocorticoid receptors and Ser-843 and Leu-848 in mineralocorticoid receptors in their differential responses to cortisol and aldosterone. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **159**, 31–40
- Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 384–391
- Gravez, B., Tarjus, A., Jimenez-Canino, R., El Moghrabi, S., Messaoudi, S., Alvarez de la Rosa, D., and Jaisser, F. (2013) The diuretic torasemide does not prevent aldosterone-mediated mineralocorticoid receptor activation in cardiomyocytes. *PLoS ONE* **8**, e73737
- Ou, X. M., Storrington, J. M., Kushwaha, N., and Albert, P. R. (2001) Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT_{1A} receptor gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 14299–14307
- Gomez-Sanchez, C. E., de Rodriguez, A. F., Romero, D. G., Estess, J., Warden, M. P., Gomez-Sanchez, M. T., and Gomez-Sanchez, E. P. (2006) Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* **147**, 1343–1348
- Refolio, E., Caverio, S., Marcon, E., Freire, R., and San-Segundo, P. A. (2011) The Ddc2/TRIP checkpoint protein monitors meiotic recombination intermediates. *J. Cell Sci.* **124**, 2488–2500
- Cheng, Y., and Prusoff, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108
- Jimenez-Canino, R., Lorenzo-Díaz, F., Jaisser, F., Farman, N., Giraldez, T., and Alvarez de la Rosa, D. (2016) Histone deacetylase 6-controlled Hsp90 acetylation significantly alters mineralocorticoid receptor subcellular dynamics but not its transcriptional activity. *Endocrinology* **157**, 2515–2532

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

156 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

156 / 212

The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes

Basile Gravez¹, Antoine Tarjus¹, Ruben Jimenez-Canino², Soumaya El Moghrabi¹, Smail Messaoudi¹, Diego Alvarez de la Rosa², Frederic Jaisser^{1,3*}

1 INSERM Unité 872, Université Pierre et Marie Curie, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France, **2** Department of Physiology and Institute of Biomedical Technologies, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain, **3** Centre d'Investigation Clinique, Institut Lorrain du Cœur et des Vaisseaux, Centre Hospitalier Universitaire de Braibois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Abstract

Aldosterone binds to the mineralocorticoid receptor (MR) and exerts pleiotropic effects beyond enhancing renal sodium reabsorption. Excessive mineralocorticoid signaling is deleterious during the evolution of cardiac failure, as evidenced by the benefits provided by adding MR antagonists (MRA) to standard care in humans. In animal models of cardiovascular diseases, MRA reduce cardiac fibrosis. Interestingly diuretics such as torasemide also appear efficient to improve cardiovascular morbidity and mortality, through several mechanisms. Among them, it has been suggested that torasemide could block aldosterone binding to the MR. To evaluate whether torasemide acts as a MRA in cardiomyocytes, we compared its effects with a classic MRA such as spironolactone. We monitored ligand-induced nuclear translocation of MR-GFP and MR transactivation activity in the cardiac-like cell line H9C2 using a reporter gene assay and known endogenous aldosterone-regulated cardiac genes. Torasemide did not modify MR nuclear translocation. Aldosterone-induced MR transactivation activity was reduced by the MRA spironolactone, not by torasemide. Spironolactone blocked the induction by aldosterone of endogenous MR-responsive genes (Sgk-1, PAL-1, Orosomucoid-1, Rgs-2, Serpina-3, Tenascin-X), while torasemide was ineffective. These results show that torasemide is not an MR antagonist; its association with MRA in heart failure may however be beneficial, through actions on complementary pathways.

Citation: Gravez B, Tarjus A, Jimenez-Canino R, El Moghrabi S, Messaoudi S, et al. (2013) The Diuretic Torasemide Does Not Prevent Aldosterone-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation in Cardiomyocytes. PLoS ONE 8(9): e73737. doi:10.1371/journal.pone.0073737

Editor: Philippe Rouet, I2MC INSERM UMR U1048, France

Received: May 8, 2013; **Accepted:** July 23, 2013; **Published:** September 9, 2013

Copyright: © 2013 Gravez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from INSERM (Institut National pour la Santé et Recherche Médicale), a CEVA company research grant, the "Centre de Recherche Industrielle et Technique" and the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain), grant BFU2010-16265 to D.A.R. B.G. and A.T. were recipients of Ph.D. grant from the French Ministry of Research. R.J.-C. is supported by a predoctoral fellowship from Cajacanarias (Spain). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: As mentioned in the funding sources, this work was partly supported by a grant from the CEVA company. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

Introduction

The use of loop diuretics such as furosemide and torasemide is classically included in the therapeutic arsenal for the symptomatic treatment of congestive heart failure. The TORasemide In Congestive heart failure trial (TORIC), showed that torasemide had more beneficial effects on mortality and morbidity of patients with CHF than furosemide [1]. Part of the benefit may be related to the different pharmacokinetic properties of torasemide, such as the longer half-life, the longer duration of action and the higher bioavailability as compared to furosemide. However it has also been suggested that torasemide has pharmacodynamic properties beyond its loop diuretic effect. Indeed, torasemide has specific vascular effects as compared to furosemide: it inhibits angiotensin II (AngII)-induced vasoconstriction in the aorta of Spontaneously Hypertensive Rats [2] as well as AngII-stimulated vascular smooth muscle cell growth [3]. Torasemide also inhibits thromboxane A2-induced vasoconstriction in isolated canine artery [4]. Furthermore, a possible blockade of mineralocorticoid receptor binding of aldosterone (called anti-aldosterone effect in the initial paper)

has been reported for torasemide by the group of Uchida in 1991: administration of a relatively high dose of torasemide significantly inhibited in vivo binding of aldosterone to its receptor in the cytoplasmic fraction of rat kidney homogenates, whereas furosemide had no effect [5]. This results led to the hypothesis that torasemide may also act as a mineralocorticoid receptor antagonist.

Indeed, inappropriate mineralocorticoid signaling has been shown to play an important role in the progression of cardiovascular (CV) disease. Aldosterone (Aldo) is a main regulator of renal sodium reabsorption with an overall effect on volume and blood pressure. Aldo binds to the mineralocorticoid receptor (MR), a transcription factor of the nuclear receptor family present in the kidney and also in non-epithelial cells [6]. New extra-renal pathophysiological effects of this hormone have been characterized, extending its actions to the CV system and inappropriate MR activation has been shown to promote cardiac fibrosis in experimental models [7]. The Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) [8], the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS)

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

[9] and Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF) [10] clinical trials have demonstrated that the addition of MR antagonists to standard care markedly reduced the overall and cardiovascular mortality in patients with left ventricular systolic dysfunction and mild or severe symptoms of chronic heart failure (HF) or with signs of HF after acute myocardial infarction. The beneficial effects of MR antagonists in HF are associated with a reduction of cardiac fibrosis [7].

In patients with chronic HF, torasemide has been reported to reduce myocardial fibrosis [11–13]. As this effect was not observed in furosemide-treated patients, the ability of torasemide to act on myocardial fibrosis might be related to interference with profibrotic factors such as aldosterone and AngII.

This putative anti-aldosterone/anti-mineralocorticoid receptor property of torasemide has potential therapeutic outcomes in the treatment of HF. From a clinical point of view, it is therefore important to determine whether torasemide and spironolactone, the classical mineralocorticoid receptor antagonist (MRA), have similar targets and whether these drugs should be associated to potentiate their efficacy in the treatment of HF. The aim of this study was to analyze whether torasemide acts as a MRA in cardiomyocytes, in comparison with spironolactone.

Materials and Methods

Ligand-induced MR Nuclear Translocation Assay

COS-7 is a fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue classically used for transactivation assays due to the absence of endogenous expression of MR or the related glucocorticoid receptor (GR) [14]. COS-7 cells were obtained from the American Type Culture Collection and grown in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were transiently transfected with a functional fluorescent variant of the mouse MR (MR-147-GFP) [15] using jetPRIME (Polyplus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturers instructions. At the time of transfection, cells grown on coverslips were transferred to medium containing charcoal-stripped serum (Lonza, Barcelona, Spain). Forty-eight hours after transfection, cells grown on coverslips were placed under an Olympus Fluoview FV1000 confocal microscope with an imaging chamber pre-heated to 37°C. For imaging experiments, culture medium was substituted by extracellular saline (10^{-3} mol/liter: NaCl, 137; KCl, 4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; glucose, 10; HEPES, 10; pH 7.4). Cells were treated or not with 10^{-8} M aldosterone, 10^{-6} M torasemide (Sigma, St. Louis, MO) and 10^{-6} M spironolactone (Sigma, St. Louis, MO) and images were acquired every 2 minutes (min) for one hour. Total and nuclear fluorescence intensity was analyzed frame by frame in individual cells using the manufacturers software (Olympus). Data processing and curve fitting were performed using Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

H9C2-MR Cardiomyocyte Transactivation Assay

H9C2-MR cells is a clonal cell line of cardiomyocytes derived from the embryonic rat ventricle that stably expresses the MR [16]. H9C2-MR cells (kindly provided by A Fejes-Toth) were stably transfected with a MMTV-Luc reporter construct [17] (kindly provided by H. Richard-Foy) using lipofectamine 2000 as previously described [18]. Clone 23, thereafter referred as H9C2-MR/MMTV-Luc, was selected for further transactivation studies.

H9C2-MR/MMTV-Luc cells were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum plus antibiotic (penicillin-streptomycin; Invitrogen, Carlsbad, CA). 24 h before treatment, cells were grown in steroid-free medium.

Cells were then treated for 24 h with aldosterone, spironolactone, the GR antagonist RU 38486 (10^{-6} M; Sigma) or torasemide, alone or in combination. Luciferase activity was assayed according to the manufacturers instructions (Dual-Light[®] Luciferase Assay; Applied Biosystems).

Gene Expression in H9C2-MR Cells

H9C2-MR cells were treated with various concentrations (as indicated in figure legends) of aldosterone, torasemide and/or spironolactone and the expression of the MR-modulated genes was measured using quantitative RT-PCR for Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1 (Sgk-1), Orosomucoid-1, Serpina-3, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), Tenascin-X and Regulator of G protein signaling-2 (Rgs-2).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cells (4 to 8 wells per condition) using TRIZOL[®] reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol, and DNase-treated. Reverse transcription was performed with 2 µg of total RNA, random primers (Invitrogen) and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Transcripts levels were analyzed by real time PCR in an iCycler iQ apparatus (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) with SYBR Green I detection. The reactions were performed in duplicate for each sample using a qPCR MasterMix Plus SYBR with fluorescein (Eurogentec, Angers, France) with 5×10^{-7} M of each sense and antisense primer and 6 ng of cDNA in 15 µL total volume. The thermal cycling parameters were: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Relative expression of the mRNA was quantified using the equation described by M.W. Pfaffl [19]: ratio = $(E_{\text{target}})^{C_{\text{target}}(\text{mean control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{C_{\text{ref}}(\text{mean control-sample})}$. The mRNA levels were normalized for β-actin mRNA in samples obtained from cultured cells. Values in control conditions were set as 1 for each gene, and fold changes are provided on the figures. The sequences of the specific primers are detailed in Table S1.

Statistical Analysis

Results are provided as mean ± SEM. Differences between experimental conditions were tested by the Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks test. The Newman-Keuls posthoc test was used to adjust for multiple comparisons (SigmaPlot V.11.0 software). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Effect of Torasemide on MR Translocation into the Nucleus

MR is a nuclear transcription factor. Upon ligand binding, MR shuttles from its cytoplasmic localization into the nucleus. We first analyzed the kinetics of ligand-induced MR translocation in COS-7 cells transiently transfected with the previously described MR-147-GFP functional fluorescent variant of MR [15]. It has previously been shown that under non-stimulated conditions, MR is present both in the cytoplasm and the nucleus, but addition of aldosterone induces nuclear accumulation of the receptor [20]. In cells treated with 10^{-8} M aldosterone, cytosolic MR-GFP initiated its translocation to the nucleus within minutes, with a half-maximal translocation time of approximately 18 minutes (Figure 1). In cells treated with 10^{-6} M torasemide alone (without aldosterone) no translocation of the MR-GFP was detected. Spironolactone alone (10^{-6} M), however, induced MR transloca-

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

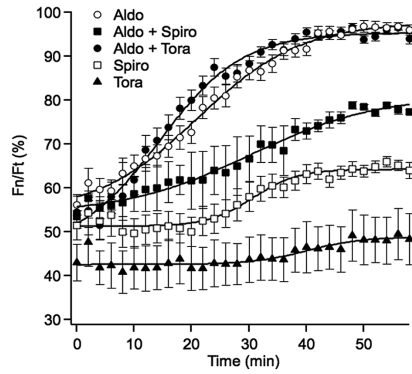


Figure 1. In vivo kinetics of nuclear translocation of MR in COS-7 cells. COS-7 cells transfected with GFP-MR were treated with 10^{-8} M aldosterone (Aldo), 10^{-8} M aldosterone + 10^{-6} M torasemide (Aldo+Tora), 10^{-8} M aldosterone + 10^{-6} M spironolactone (Aldo+Spiro), 10^{-6} M spironolactone (Spiro) or 10^{-6} M torasemide (Tora), starting at time 0. Individual points represent the average percentage fluorescent intensity of the nucleus vs. total cellular fluorescence (Fm/Ft) measured in individual cells over the indicated period of time (\pm SE, n=16). Data points were fitted to a sigmoid curve. doi:10.1371/journal.pone.0073737.g001

tion but with a much slower rate than aldosterone alone (Figure 1), consistently with previously published reports [20].

Simultaneous addition of 10^{-6} M torasemide and 10^{-8} M aldosterone did not change the kinetics of aldosterone-induced MR-GFP nuclear translocation while spironolactone (10^{-6} M) slowed down aldosterone-induced MR nuclear translocation (Figure 1), indicating that torasemide and spironolactone behave differently, regarding Aldo-induced MR nuclear translocation.

Effect of Torasemide on Aldosterone-mediated MR Transactivation Activity

A transactivation assay was set up in the rat H9C2-MR cardiomyocytes cell line expressing moderate levels of rat MR [16]. The system allows rapid and efficient screening of MR-dependent transactivation, using a MMTV promoter construct that includes Hormone Response Elements leading to luciferase expression upon binding of MR to the Hormone Response Elements. In the absence of MR activation, luciferase is not expressed while upon MR activation, luciferase activity is expressed and can be easily detected (Figure 2A). This widely used reporter system allows efficient analysis of molecules with agonist/antagonist activity on the MR.

Addition of 10^{-8} M aldosterone induced a 3.5 fold increase in luciferase activity which was fully inhibited by the MR antagonist spironolactone (10^{-6} M) but not by the GR antagonist RU 38486 (10^{-6} M) indicating specific MR activation by aldosterone in this cellular context (Figure 2B). Spironolactone or RU38486 alone have not effects (Figure 2B). Several concentrations of spironolactone or torasemide were then tested for their inhibitory activity of the aldosterone-mediated MR activation (Figure 2C). 10^{-6} M spironolactone fully inhibited the MR transactivation induced by 10^{-8} M aldosterone while torasemide has only a weak inhibitory effect that was concentration-independent. In order to unmask a potential inhibitory effect in the presence of a lower aldosterone

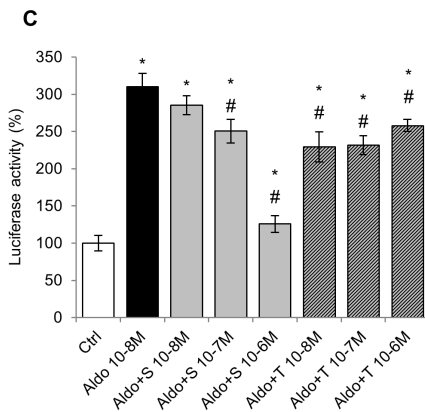
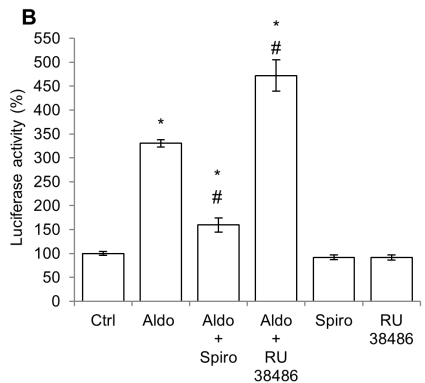
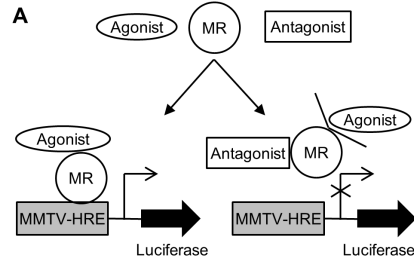


Figure 2. Effect of Torasemide on ligand-dependent transactivation activity of MR in H9C2-MR cells. A: The MMTV promoter contains Hormone Response Elements (HRE); the promoter sequence was fused to the Luciferase coding sequence. This construct was transfected into H9C2-MR cells. Upon binding of the aldosterone-MR complexes on HRE, luciferase is transcribed and light emission is enhanced, assessing MR transactivation activity. In the presence of an

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003		
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion		
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi	
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28	
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59	
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03	

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003		
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion		
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS	
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18	

MR antagonist, binding of aldosterone to MR is prevented and luciferase expression is abolished. B: 10^{-8} M aldosterone (Aldo) increased MR transactivation activity (luciferase activity) which was prevented by a 100-fold excess of the MR antagonist spironolactone (Spir; 10^{-6} M) but not by the GR antagonist RU 38486 (RU 38486; 10^{-6} M). Each antagonist alone has no effect. Mean \pm SEM (n=8). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone. C: 10^{-8} M aldosterone (Aldo) increased MR transactivation activity, which was fully inhibited by the MR antagonist spironolactone (S) at 10^{-6} M. Torasemide (T) has a slight antagonist effect independent of its concentration. Mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone.
doi:10.1371/journal.pone.0073737.g002

concentration, the effects of spironolactone and torasemide were also tested in the presence of 10^{-9} M aldosterone. In these conditions, torasemide has no inhibitory effect at difference with a dose-dependent antagonist activity of spironolactone (Figure S1).

Effect of Torasemide on MR-mediated Endogenous Gene Expression in H9C2-MR Cells

The MMTV promoter, despite being classically used as a reporter of MR activation, is distinct from natural targets for the MR in cardiomyocytes. It could therefore be argued that activation/antagonism of MR may be different in a natural cell context. We took advantage of our previous work that identifies MR-modulated cardiac genes [21] to test the effect of torasemide, in comparison to spironolactone, in H9C2-MR cells. We analyzed the expression of the Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1, Sgk-1 (regulated by corticosteroid hormones in kidney cells), Orosomucoid-1 (an inflammatory protein), Serpina-3, PAI-1 and Tenascin-X (genes of the extra-cellular matrix remodeling) and Rgs-2 (Regulator of G protein signaling-2). Torasemide (10^{-6} M) alone significantly decreased the basal expression (in absence of serum and aldosterone) of Orosomucoid-1 and Tenascin-X, which is indeed very weakly expressed in cardiomyocytes in the absence of aldosterone stimulation (Figure S2). We next tested the antagonist activity of torasemide. As depicted in Figure 3, in the presence of 10^{-8} M aldosterone, spironolactone partly or fully inhibited aldosterone-induced expression of aldosterone/MR target genes while torasemide had no effect, even at a high concentration (10^{-6} M). Similar effects were observed when a lower concentration of aldosterone was used (10^{-9} M) (Figure 4) indicating that the absence of antagonist activity of torasemide was not due to unfavorable competition with a high aldosterone concentration. Interestingly, the potency of spironolactone varies among the analyzed target genes: PAI-1, Orosomucoid-1 and Serpina-3 were inhibited with 10 fold lower spironolactone concentration (10^{-8} M) than Sgk-1, Rgs-2 and Tenascin-X (Figure 4). We next evaluated whether a torasemide (10^{-6} M) could enhance the sensitivity of MR toward spironolactone in aldosterone-treated H9C2-MR cells. To this purpose, we treated cells with a low dose of spironolactone (10^{-9} M) that was not sufficient to reduce the increase of gene expression with 10^{-8} M aldosterone. Addition of torasemide did not sensitize the MR to spironolactone as shown by the analysis of Aldo-induced gene expression of Orosomucoid-1, Sgk-1 and Tenascin-X (Figure S2).

Discussion

Spectacular progress has been made in the treatment of heart failure during the last decades. Combining drugs of different therapeutic classes such as diuretics, beta-blockers, Angiotensin Converting Enzyme inhibitors and Angiotensin receptor blockers led to major clinical benefits on morbidity-mortality. Despite these

progresses, heart failure remains a life-threatening disease, requiring further improvement of the therapeutic strategies. Blocking the mineralocorticoid receptor has been proposed and validated as an additional tool: clinical studies in patients with severe or mild heart failure demonstrated an additional benefit of MRAs administered on the top of standard therapy [8–10]. The results of these trials led to changes in the therapeutic guidelines [22,23]. One of the proposed underlying mechanisms explaining this clinical benefit relies on the decrease of myocardial fibrosis. Indeed targeting cardiac fibrosis would impact the severity of heart disease by reducing stiffness, improving cardiac hemodynamics and reducing pro-arrhythmic triggers. Cardiac anti-fibrotic therapy includes MRAs (such as spironolactone or eplerenone) and, more recently, the diuretic torasemide. Whether MRAs and torasemide act on the same pathways or not needs to be carefully addressed. Indeed if these therapeutic classes act on different pathways, it may be useful to use both of them which may lead to additive beneficial effects.

It has been proposed that torasemide has some mineralocorticoid receptor antagonist properties and torasemide is considered as an “anti-aldosterone” compound [5]. In order to test the potential MR antagonist property of torasemide, we selected several genes of different functional classes (inflammation, extracellular matrix remodelling, signalling) that were previously shown, by ourselves and by others, to be regulated by aldosterone in cardiomyocytes [16,21]. Rgs-2 (Regulator of G protein signaling-2) is a multifunctional signaling regulator and exerts GTPase-activating protein activities. Many signals that regulate cardiomyocyte growth, differentiation, and function are mediated via heterotrimeric G proteins, which are controlled by Rgs proteins [24]. Three aldosterone-regulated genes have close connections with the regulation of the extra-cellular matrix: Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), a member of the SERPIN family, is the major physiological inhibitor of tissue-type Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator, that activate plasminogen to its active form plasmin and lead to fibrinolysis. In addition to its serine protease inhibitor function, PAI-1 also alters cell/matrix interactions by binding to vitronectin [25]; Serpina-3 (also named α 1-antichymotrypsin) is a serine protease inhibitor with multiple functions including maturation of pro-MMP9 and wound healing, regulation of apoptosis and inflammation [26]; Tenascin-X belongs to the family of matricellular proteins. These proteins are extracellular matrix proteins that modulate cell-matrix interactions and collagen accumulation and organization, but do not have a direct structural role [27]. Tenascin-X is an essential regulator of collagen deposition by fibroblasts [28] and is up-regulated during fibrosis after tissue injury [27]. Orosomucoid-1 is an acute phase protein that is induced by pro-inflammatory cytokines and glucocorticoids [29]. Interestingly, elevated plasma level of Orosomucoid-1 is considered as a cardiovascular risk factor [30].

The data reported in the present study clearly do not support the concept that torasemide acts as an antagonist of the MR. Indeed using different approaches, we showed that torasemide does not behave as spironolactone, a prototypic MRA: it did not affect nuclear translocation of MR nor inhibited aldosterone-induced up-regulation of various mineralocorticoid receptor target genes in cardiomyocytes. These results are not compatible with the study of Uchida et al. [5] proposing that torasemide acts as a competitive antagonist of aldosterone binding in kidney homogenates. A tissue-specific effect of torasemide on MR binding in kidney but not cardiomyocyte is a possibility but, to our knowledge, such tissue-specific actions of MR antagonists have not been reported.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

15/02/2017 15:41:59

En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

15/02/2017 21:26:03

En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

160 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

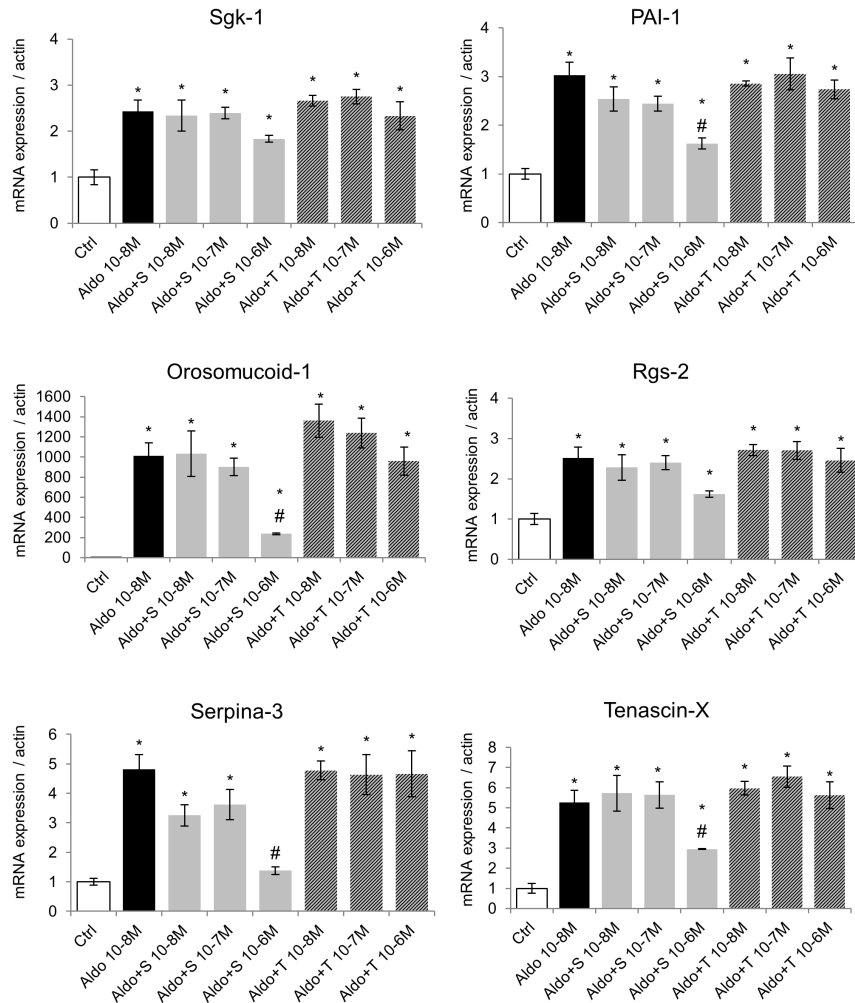


Figure 3. Torsemide does not act as a MR antagonist for the regulation of endogenous genes in H9C2-MR cells in the presence of 10⁻⁸ M aldosterone. 10⁻⁸ M aldosterone (Aldo) increased expression of the aldosterone-targets genes Sgk-1, PAI-1, Orosomucoid-1, Rgs-2, Serpina-3 and Tenascin-X. Addition of increasing doses of spironolactone (A+S) inhibited aldosterone-induced gene expression. In contrast, increasing concentrations of torsemide (A+T) had no antagonistic effect. Mean ± SEM (n=4). *p<0.05 vs control (Ctrl); # p<0.05 vs aldosterone. doi:10.1371/journal.pone.0073737.g003

From our results and previously published data, spironolactone not only competes with aldosterone for binding to MR, but it also induces ligand-dependent conformational changes that uncover nuclear localization signals, eliciting MR trafficking to the nucleus. The slower kinetics of this process when compared to aldosterone-induced nuclear translocation may reflect differences in ligand

binding kinetics and ligand-induced co-chaperone release from the aporeceptor complex [31]. Therefore, spironolactone is not a classic competitive antagonist of MR. It has been proposed that the inhibitory effect of spironolactone on MR is based on the induction of an altered receptor conformation, which in turn disrupts co-activator recruitment [32]. This could be consistent

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO Fecha: 16/02/2017 14:29:18

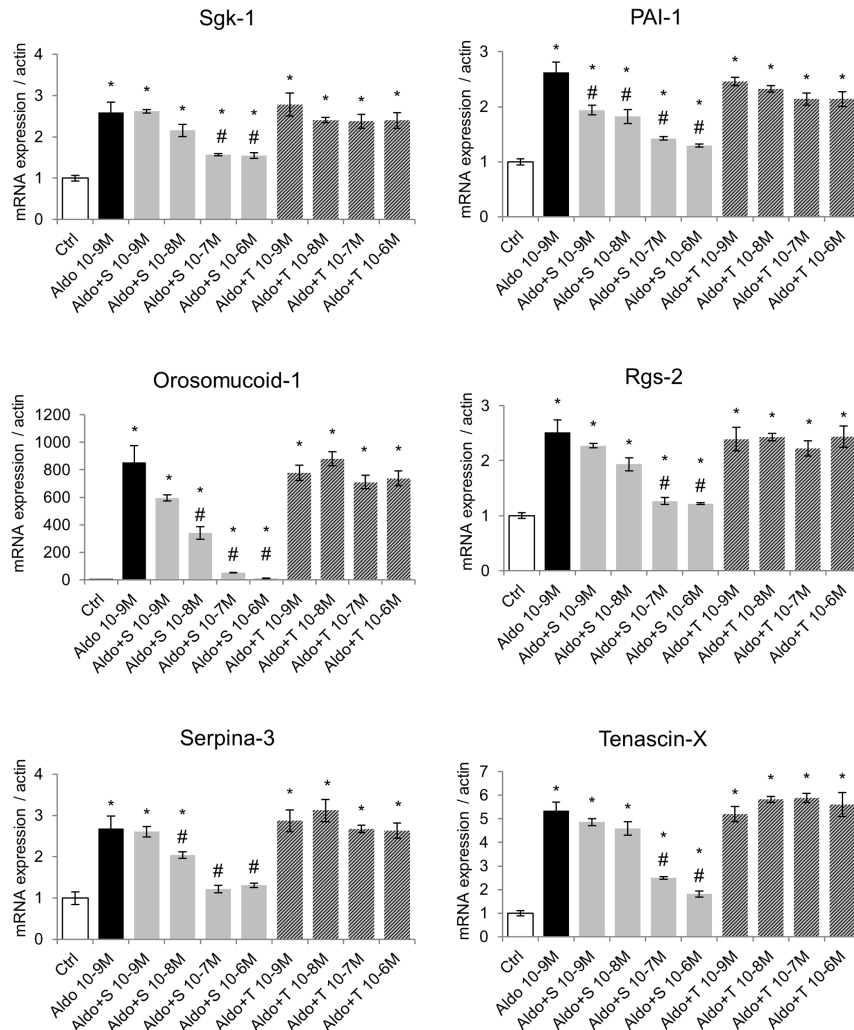


Figure 4. Torsemide does not act as a MR antagonist for the regulation of endogenous genes in H9C2-MR cells in the presence of 10^{-9} M aldosterone. 10^{-9} M aldosterone (Aldo) increased expression of the aldosterone-targets genes Sgk-1, PAI-1, Orosomucoid-1, Rgs-2, Serpina-3 and Tenascin-X. Addition of increasing doses of spironolactone (A+S) inhibited aldosterone-induced gene expression. In contrast, increasing concentrations of torsemide (A+T) had no antagonistic effect. Mean \pm SEM (n=4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone. doi:10.1371/journal.pone.0073737.g004

with recent data demonstrating that spironolactone behaves as an inverse agonist of MR [33,34] suggesting that spironolactone beneficial therapeutic actions involve the induction of MR-dependent effects that are opposite to those induced by natural agonists such as aldosterone. The molecular basis for the inverse

agonist activity is unknown. It has been proposed that spironolactone can act as an MR agonist in a cell- and promoter-specific fashion [35], but the identities of specific target genes that may be regulated by spironolactone-MR complexes remain to be elucidated.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Torasemide, at micromolar concentrations, has also been reported to inhibit aldosterone secretion *in vitro* by adrenal cells from rats, cows and guinea pig upon stimulation by potassium and AngII (among other classical aldosterone secretagogues), while furosemide has no effect on adrenal aldosterone secretion [36]. In human, torasemide has been reported to inhibit transcardiac extraction of aldosterone in patients with congestive heart failure [37], an effect which might be due to inhibition of local aldosterone synthesis, that has been reported to be increased in human heart failure [38]. *In vivo* however, in both human and dogs, torasemide, as other diuretics, increases plasma aldosterone levels to compensate sodium loss [39,40,41]. Therefore, if MR is not properly antagonized, torasemide administration would likely increase MR activation through the rise in plasma aldosterone levels rather than decrease MR-mediated pathways.

Both torasemide and spironolactone have been shown to be efficient in patients and in dogs with HF [1,42]. One can speculate that adding torasemide to spironolactone in HF would be beneficial. Torasemide has a strong diuretic effect and an anti-fibrotic effect for which a mechanism has been recently proposed: torasemide inhibits procollagen type I carboxy-terminal proteinase activation as well as lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure [11,12], resulting in normalization of left ventricular stiffness. MRAs act at different levels: MRAs prevent electrophysiological abnormalities, oxidative stress and extracellular matrix remodeling as well as inflammation [7]. Beneficial additive effects may therefore occur in patients. Such therapeutic benefit in HF remains to be addressed.

Perspectives

Taken together, these results demonstrate that the diuretic torasemide does not act as a mineralocorticoid receptor antagonist as previously proposed. This suggests that the use of torasemide together with an MR blocker could further enhance the anti-fibrotic effects of these therapeutics, especially in heart failure. This should be particularly considered since torasemide increased aldosterone, the ligand of the MR, due to its effects of the renal Na

References

- Cosin J, Diez J (2002) Torasemide in chronic heart failure: results of the TORIC study. *Eur J Heart Fail* 4: 507–513.
- Fortuno A, Muniz P, Ravassa S, Rodriguez JA, Fortuno MA, et al. (1999) Torasemide inhibits angiotensin II-induced vasoconstriction and intracellular calcium increase in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34: 138–143.
- Muniz P, Fortuno A, Zalba G, Fortuno MA, Diez J (2001) Effects of loop diuretics on angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell growth. *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 1: 14–17.
- Uchida T, Kido H, Yamanaga K, Okita M, Watanabe M (1992) A novel loop diuretic, torasemide, inhibits thromboxane A₂-induced contraction in the isolated canine coronary artery. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45: 121–124.
- Uchida T, Yamanaga K, Nishikawa M, Ohtaki Y, Kido H, et al. (1991) Anti-aldosterone effect of torasemide. *Eur J Pharmacol* 205: 145–150.
- Farman N, Rafestin-Ohlin ME (2001) Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F181–192.
- Messaoudi S, Azihani F, Delcayre C, Jaïsser F (2012) Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol* 350: 266–272.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, et al. (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med* 341: 709–717.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, et al. (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348: 1309–1321.
- Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, et al. (2011) Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364: 11–21.

balance. This should be analyzed in dedicated experimental and clinical studies.

Supporting Information

Figure S1 Effect of Torasemide on Ligand-dependent transactivation activity of MR in H9C2-MR cells. 10^{-9} M aldosterone (Aldo) increased MR transactivation activity, which was fully inhibited by the MR antagonist spironolactone (S) at 10^{-7} M while torasemide (T) has no effect. Mean \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl); # $p < 0.05$ vs aldosterone. (TIF)

Figure S2 Torasemide did not enhance MR sensitivity to a low dose of spironolactone for the regulation of endogenous genes in H9C2-MR cells. A low dose of spironolactone (10^{-8} M) did not block aldosterone-induced response of Orosomucoid-1, Sgk-1 and Tenascin-X. Torasemide (10^{-6} M) did not confer higher sensitivity to the spironolactone antagonist when spironolactone and torasemide were combined. Mean \pm SEM (n = 4). * $p < 0.05$ vs control (Ctrl). (TIF)

Table S1 Sequences of the specific primers. Actin: β -actin; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; Rgs-2: Regulator of G protein signaling-2; Sgk-1: Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1. (TIF)

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Aniko Naray-Fejes-Toth for the H9C2-MR cells.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BG SEM FJ. Performed the experiments: BG RJC SEM. Analyzed the data: BG SM DAR FJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: BG AT RJC SEM. Wrote the paper: BG FJ. Obtained permission for use of cell line: FJ DAR.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

- cardiomyocytes: from cultured cells to mouse heart. *Endocrinology* 151: 4467–4476.
22. Butler J, Ezekowitz JA, Collins SP, Givertz MM, Teerlink JR, et al. (2012) Update on aldosterone antagonists use in heart failure with reduced left ventricular ejection fraction. *Heart Failure Society of America Guidelines Committee. J Card Fail* 18: 265–281.
 23. Taylor J (2012) The 2012 ESC Guidelines on Heart Failure. *Eur Heart J* 33: 1703–1704.
 24. Riddle EL, Schwartzman RA, Bond M, Insel PA (2005) Multi-tasking RGS proteins in the heart: the next therapeutic target? *Circ Res* 96: 401–411.
 25. Lijnen HR (2005) Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 3: 35–45.
 26. Goopit B, Lomas DA (2009) Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem* 78: 147–176.
 27. Schellings MW, Pinto YM, Heymans S (2004) Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res* 64: 24–31.
 28. Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Alzal V, et al. (2002) Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat Genet* 30: 421–425.
 29. Mackiewicz A, Mackiewicz K (1995) Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. *Glycoconj J* 12: 241–247.
 30. Engstrom G, Hedblad B, Tyden P, Lindgarde F (2009) Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with increased incidence of heart failure: a population-based cohort study. *Atherosclerosis* 202: 617–622.
 31. Couette B, Marsaud V, Baulieu EE, Richard-Foy H, Rafestin-Oblin ME (1992) Spironolactone, an aldosterone antagonist, acts as an antigluco-corticosteroid on the mouse mammary tumor virus promoter. *Endocrinology* 130: 430–436.
 32. Rogerson FM, Yao YZ, Smith BJ, Dimopoulos N, Fuller PJ (2003) Determinants of spironolactone binding specificity in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 31: 573–582.
 33. Mihaikidou AS, Loan Le TY, Mardini M, Funder JW (2009) Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction. *Hypertension* 54: 1306–1312.
 34. Sier CT Jr (2009) Mineralocorticoid receptors in myocardial infarction. *Hypertension* 54: 1211–1212.
 35. Massaad C, Lombes M, Aggerbeck M, Rafestin-Oblin ME, Barouki R (1997) Cell-specific, promoter-dependent mineralocorticoid agonist activity of spironolactone. *Mol Pharmacol* 51: 285–292.
 36. Goodfriend TL, Ball DL, Oelkers W, Bahr V (1998) Torasemide inhibits aldosterone secretion in vitro. *Life Sci* 63: PL45–50.
 37. Tsutomoto T, Sakai H, Wada A, Ishikawa C, Ohno K, et al. (2004) Torasemide inhibits transcardiac extraction of aldosterone in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 44: 2252–2253.
 38. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, Satoh H, Akatsu T, et al. (2002) Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond)* 102: 381–386.
 39. Hori Y, Takusagawa F, Kadai H, Uechi M, Hoshi F, et al. (2007) Effects of oral administration of furosemide and torasemide in healthy dogs. *Am J Vet Res* 68: 1058–1063.
 40. Yamato M, Sasaki T, Honda K, Fukuda M, Akutagawa O, et al. (2003) Effects of torasemide on left ventricular function and neurohumoral factors in patients with chronic heart failure. *Circ J* 67: 384–390.
 41. Uechi M, Matsuoka M, Kuwajima E, Kaneko T, Yamashita K, et al. (2003) The effects of the loop diuretics furosemide and torasemide on diuresis in dogs and cats. *J Vet Med Sci* 65: 1057–1061.
 42. Oyama MA, Peddle GD, Reynolds CA, Singletary GE (2011) Use of the loop diuretic torasemide in three dogs with advanced heart failure. *J Vet Cardiol* 13: 287–292.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046

Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

15/02/2017 21:26:03

164 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083

Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

164 / 212

Supporting Information (doi:10.1371/journal.pone.0073737):

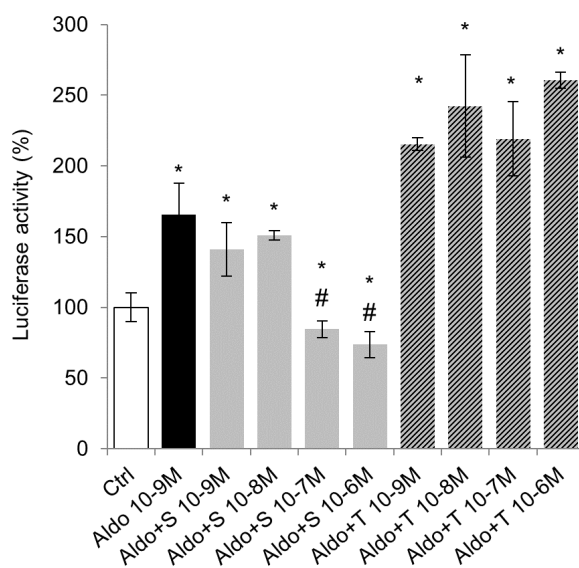


Figure S1. Effect of Torasemide on Ligand-dependent transactivation activity of MR in H9C2-MR cells. 10^{-9} M aldosterone (Aldo) increased MR transactivation activity, which was fully inhibited by the MR antagonist spironolactone (S) at 10^{-7} M while torasemide (T) has no effect. Mean \pm SEM (n=4). *p<0.05 vs control (Ctrl); # p<0.05 vs aldosterone. doi:10.1371/journal.pone.0073737.s001

Este recibo incorpora firma electr3nica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la direcci3n: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	C3digo de verificaci3n: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

165 / 212

Este recibo incorpora firma electr3nica de acuerdo a la Ley 59/2003	
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la direcci3n: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	C3digo de verificaci3n: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

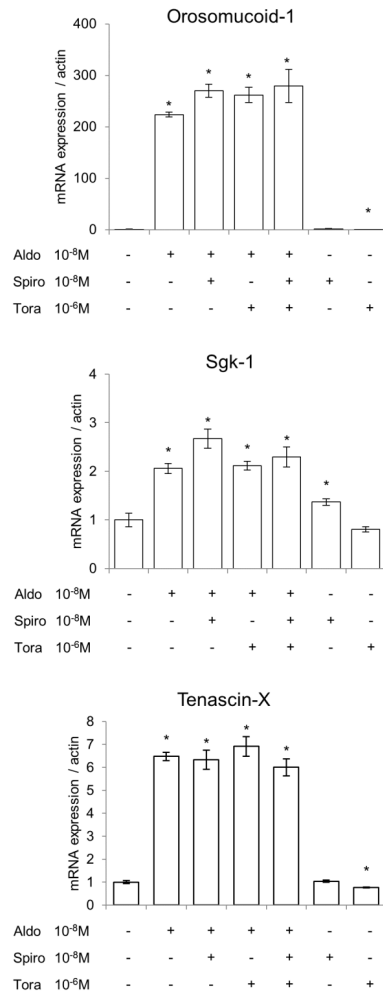


Figure S2. Torasemide did not enhance MR sensitivity to a low dose of spironolactone for the regulation of endogenous genes in H9C2-MR cells. A low dose of spironolactone (10^{-8} M) did not block aldosterone-induced response of Orosomuroid-1, Sgk-1 and Tenascin-X. Torasemide (10^{-6} M) did not confer higher sensitivity to the spironolactone antagonist when spironolactone and torasemide were combined. Mean \pm SEM (n=4). *p<0.05 vs control (Ctrl). doi:10.1371/journal.pone.0073737.s002

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ 15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ 15/02/2017 21:26:03

166 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO Fecha: 16/02/2017 14:29:18

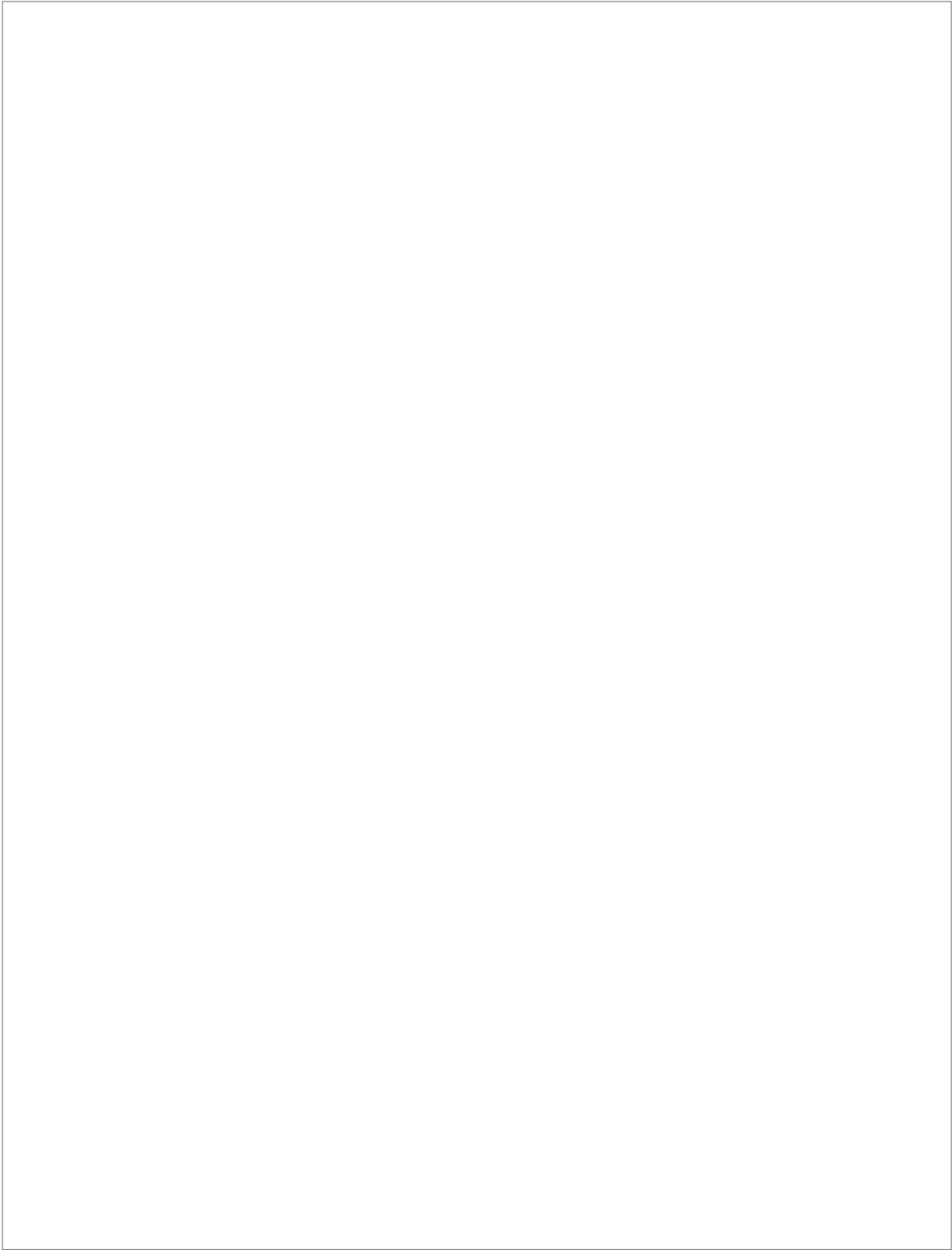
Genes	Forward	Reward
Actin	GCC GGG ACC TGA CAG ACT A	GGC CAT TCT TTG CTC GAA
PAI-1	GC CTC CTC ATC CTG CCT AAG T	TG TGC CGC TCT CGT TCA CCT C
Orosomuroid-1	GCA TGG CGC TGC ACA TGG TT	TGC TTG AAC ACG GGG TCT CGG A
Rgs-2	AA GAC CCG TTT GAG CTA TTT C	GA ATG CAG CAA GCC CAT ATT T
Serpina-3	AGA CAA GGG GAC ACA ACT GG	GAG ATG CTA AGT GGG GAG AA
Sgk-1	GC TCG AAG TAC CCT CAC CTA	AGG GGT TGG CGT TCA TAA GTT
Tenascin-X	CG TGT TCG CCC AGT ATG ACT T	AT TGA GAT TGG CGT AGT GAC A

Table S1. Sequences of the specific primers. Actin: β -actin; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1; Rgs-2: Regulator of G protein signaling-2; Sgk-1: Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1. doi:10.1371/journal.pone.0073737.s003

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

167 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

168 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

168 / 212

ANEXO 2: MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN

- 1 **Jimenez-Canino, R.**, Lorenzo-Díaz, F., Bailey M. A., Livingstone, D. E., Jaisser, F., Farman, N., & Alvarez de la Rosa, D. (manuscript in press). SUMOylation of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Regulates Cortisol-dependent Mineralocorticoid Receptor Activity.

153

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

169 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

169 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

**SUMOylation of 11 β -Hidroxy steroid Dehydrogenase Type 2 Regulates Cortisol-dependent
Mineralocorticoid Receptor Activity**

Rubén Jiménez-Canino¹, Fabián Lorenzo-Díaz^{1,‡}, Matthew A. Bailey², Dawn E. Livingstone², Frederic
Jaisser³, Nicolette Farman³, Diego Alvarez de la Rosa^{1,*}

¹*Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Instituto de Tecnologías Biomédicas y Centro de
Investigaciones Biomédicas de Canarias (CIBICAN), Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain;* ²*BHF
Centre for Cardiovascular Science and Centre for Integrative Physiology, University of Edinburgh,
United Kingdom;* ³*INSERM UMRS 1138, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre
et Marie Curie, Paris, France*

*** To whom correspondence should be addressed:** Dr. Diego Alvarez de la Rosa, Area de Fisiología,
Universidad de La Laguna, Campus de Ciencias de la Salud s/n. 38071 La Laguna, Tenerife, Spain.
Telephone: +34-922-319-968. Fax: +34-922-319-397. E-mail: diego.alvarez@ull.edu.es

‡Present address: Applied Genomics Group (G2A), Area de Genética, Universidad de La Laguna,
Tenerife, Spain.

Grant support: This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad,
Spain (MINECO, BFU2013-47089-R and BFU2016-78374-R, to D.A.R.), XXX to M.A.B. and the
European Cooperation in Science and Technology (COST) action ADMIRE (BM1301). R.J-C. was
supported by pre-doctoral fellowships from Cajacanarias (Spain) and FPU Program (Ministerio de
Educación, Spain).

Disclosure summary: The authors have nothing to disclose.

1

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

171 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

171 / 212

Abstract

The enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2) is selectively expressed in aldosterone target tissues, conferring aldosterone selectivity for the mineralocorticoid receptor (MR) by converting 11 β -hydroxyglucocorticoids to inactive 11-ketosteroids. Congenital deficiency of 11 β -HSD2 causes a form of salt-sensitive hypertension known as the syndrome of apparent mineralocorticoid excess (AME). The disease phenotype, which ranges from mild to severe, correlates well with the reduction in enzyme activity. Furthermore, polymorphisms in the *HSD11B2*, the gene encoding 11 β -HSD2, have been linked to blood pressure and salt-sensitivity, a major cardiovascular risk factor. Regulation of 11 β -HSD2 expression by different factors such as sex steroids or vasopressin has been described, but post-translational modulation of 11 β -HSD2 activity has not been explored. Analysis of 11 β -HSD2 sequence revealed a consensus site for conjugation of small ubiquitin-related modifier (SUMO) peptide. SUMOylation is a major post-translational regulatory event in several cellular processes. Our results demonstrate that 11 β -HSD2 is SUMOylated at lysine 266. Non-SUMOylatable mutant K266R was unable to prevent cortisol-dependent MR nuclear translocation. The same effect was achieved by enzymatic deSUMOylation of 11 β -HSD2 by SENP1 co-expression. These data suggest that SUMOylation of residue K266 is essential to maintain enzyme activity. However, in the presence of 11 β -HSD2-K266R nuclear MR shows decreased transactivation due at least in part to a failure to recruit transcriptional co-regulators. Wild type 11 β -HSD2 and K266R mutant showed similar cortisol to cortisone conversion rate, indicating that enzymatic activity is not directly affected by SUMOylation. Taken together, our data suggests that SUMOylation of 11 β -HSD2 at residue K266 controls cortisol-mediated MR nuclear translocation and activation independently of the ability of the enzyme to metabolize cortisol.

2

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

172 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

172 / 212

Introduction

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) isozymes catalyze the interconversion between biologically active 11 β -hydroxyglucocorticoids and inactive 11-ketosteroids [1]. The isoform 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2) catalyzes the NAD-dependent reaction to convert cortisol to inactive cortisone [2]. The opposite reaction is NADP(H)-dependent and is catalyzed by the isozyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), leading to increased local cortisol concentration, mainly in the liver [3]. 11 β -HSD2 shows a cell-specific expression in aldosterone target tissues, such as epithelial cells from distal colon and principal cells of the distal nephron, where its main function is to protect the non-selective mineralocorticoid receptor (MR) from non-specific activation by glucocorticoids [4]. Aldosterone main physiological function is to regulate electrolyte reabsorption/excretion and has a key role in regulating intravascular volume through MR activation, mainly on the renal distal convoluted tubule and cortical collecting duct. MR activation promotes epithelial sodium channel (ENaC) expression and activity in apical membrane of epithelial cells, where it acts to increase sodium reabsorption [5]. Glucocorticoids such as cortisol or corticosterone are ligands of glucocorticoid receptor (GR), but also bind MR with high affinity, working as agonists in both receptors. Since glucocorticoids are present in plasma at a much higher concentration than aldosterone [6] and activity of MR and GR is not interchangeable [7], the presence of 11 β -HSD2 is essential to prevent inappropriate MR activation by glucocorticoids in aldosterone target tissues [4]. 11 β -HSD2 activity can be exceeded by cortisol hypersecretion leading to high cortisol levels and MR overactivation [8]. Decreased 11 β -HSD2 activity also leads to overactivation of MR by endogenous glucocorticoids. In both cases there is excess renal sodium retention and consequently a salt sensitive increase in blood pressure [9]. Loss-of-function mutations of 11 β -HSD2 coding gene (HSD11B2) lead to congenital hypertension known as the syndrome of apparent mineralocorticoid excess (AME) [10]. AME is characterized by hypertension and hypokalemia with low renin and aldosterone circulating levels [11]. An AME-like phenotype is also shown by patients intoxicated with natural licorice, which contains glycyrrhetic acid that together with its derivative, carbenoxolone, is able to inhibit 11 β -HSD2 [12]. The severity of AME

3

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

173 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

173 / 212

symptoms correlates well with the underlying enzyme activity. Several polymorphisms in HSD11B2, some of them known to produce slightly decreased 11 β -HSD2 activity, have been correlated with salt-sensitive increase of blood pressure in healthy volunteers or in essential hypertension [13-19]. All this evidence indicates that appropriate control of 11 β -HSD2 expression and activity is essential for blood pressure regulation. However, there have been no descriptions of cellular mechanisms that dynamically regulate 11 β -HSD2, such as post-translational modifications.

Small ubiquitin-related modifiers (SUMO) are ~11 kDa proteins that are post-translationally conjugated to other proteins. This reversible post-translational modification is typically observed in nuclear proteins, related to transcription factor regulation [20], DNA damage response [21], mitosis or cell progression [22]. However, SUMOylation has also been observed as a regulatory modification for cytosolic or plasma membrane proteins [23]. Analysis of the human 11 β -HSD2 sequence uncovered a canonical SUMOylation consensus motif around lysine 266 (Figure 1). Based on that, we hypothesized that SUMOylation of K266 in 11 β -HSD2 may be involved in regulating its activity and therefore could affect MR glucocorticoid-dependent transcriptional activity. To test this hypothesis we co-expressed MR with wild type or non-SUMOylatable mutant 11 β -HSD2-K266R and studied cortisol-dependent nuclear translocation, receptor activation and gene transactivation. In addition, we measured 11 β -HSD2 enzymatic activity and cortisol binding to MR. Our results show that 11 β -HSD2 is SUMOylated at residue K266. Cortisol-dependent MR nuclear translocation is prevented by wild type 11 β -HSD2 in a dose-dependent way, but not by mutant K266R, suggesting that SUMOylation is essential to preserve enzymatic activity. However, 11 β -HSD2 enzymatic activity was not affected by the mutation. Paradoxically, MR translocated in the presence of 11 β -HSD2-K266R shows diminished transactivation and lower ability to recruit transcriptional co-activators. Our results strongly suggest that 11 β -HSD2 is able to regulate cortisol-dependent MR activation independently of the enzymatic ability to remove cortisol.

4

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

174 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Material and methods

Sequence analysis

We used prediction algorithm GPS-SUMO [24] to search for consensus SUMOylation motifs ((B-K-x-D/E, where B is a large hydrophobic residue, K is the lysine conjugated to SUMO, x is any amino acid, and D or E is an acidic residue Asp or Glu) in 11 β -HSD2 from different species. Additionally, GPS-SUMO was used to predict putative SUMO interaction motifs (SIM) in the same sequences. Multiple sequence comparison was performed with Clustal Omega (European Bioinformatics Institute).

Plasmid constructs

Generation and use of a functional fluorescent derivatives of MR with insertion of YFP or GFP after amino acid 147 (MR-147-YFP/GFP) has been previously described [25-27]. Plasmid pcDNA3.1-MR, expressing hMR-WT was previously described [28]. Plasmid expressing wild-type human 11 β -HSD2 fused to flag epitope (HSD2-Flag) cloned in pcDNA3 (Invitrogen) was a kind gift from Dr. Alex Odermatt (University of Berne, Switzerland) and has been previously described (Odermatt, 1999). 11 β -HSD2 sequence was amplified by PCR and subcloned in pCFP-N1 vector (Clontech) to produce an in-frame fusion with the cyan fluorescent protein (CFP) (HSD2-CFP). 11 β -HSD2 non-SUMOylatable mutant K266R (HSD2-K266R) and AME mutants R337C (HSD2-R337C) [29] or R213C (HSD2-R213C) [30] were obtained introducing point mutations by site-directed mutagenesis using the Quickchange Lightning Kit (Agilent Technologies). Human SUMO1 cloned in pEYFP-C1 (Clontech) to express YFP-SUMO1 was obtained from Addgene (plasmid 13380) [31]. Sequence of human deSUMOylase Senp1 cloned in pFlag-CMV (Sigma) to express epitope-tagged FLAG-Senp1 was obtained from Addgene collection (plasmid 17357) [32]. Senp1 sequence was amplified by PCR and subcloned in pcDNA 3.1 (Invitrogen) to remove the FLAG epitope from the original construct in order to prevent cross-reactions in PLA assays (see below). SRC-1 sequence was amplified by PCR from mouse hippocampus cDNA using a proofreading DNA polymerase. The reverse oligonucleotide contained the coding sequence of HA epitope tag. The resulting PCR product was cloned using pcDNA3.1 Directional TOPO Expression kit (Thermo Fischer Scientific). All constructs and mutations were confirmed by DNA sequencing.

5

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

175 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

175 / 212

Cell culture, transfection and hormone treatment

We used COS-7 cells, which lack endogenous MR and GR expression [33]. COS-7 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were transfected with Jetprime (Polyplus Transfection, Illkirch, France) as described before [25, 26]. pcDNA3.1 (Invitrogen) was used as a control in transfections. At the time of transfection cells were washed and transferred to growth medium supplemented with charcoal-stripped fetal bovine serum (Lonza) to eliminate steroids. Twenty-four hours after transfection, cells were washed and treated with the indicated amounts of aldosterone or cortisol. Aldosterone and cortisol were obtained from Sigma, dissolved in ethanol, and added to cells to the final concentration indicated for each experiment. Control cells were treated with ethanol at the same dilution used for treatments (1:1000).

Immunoprecipitation and western blot analysis

11 β -HSD2 immunoprecipitation was performed using a mouse monoclonal antibody against FLAG epitope (Sigma) at 1:150 dilution in lysis buffer (in mM: NaCl, 170; EDTA, 1; DTT, 1; Tris-HCl, 20; pH 7.6) supplemented with 0.5% Nonidet-P40 and protease inhibitor cocktail. Antibody-antigen complex capture was performed using Proteome Protein A and Protein G Magnetic Beads kit (Millipore). Western blot analysis was performed as previously described [25, 26]. Human 11 β -HSD2 was detected with rabbit polyclonal antibody (H-145; Santa Cruz Biotechnology). MR was detected with mouse monoclonal antibody rMR365-4D6, developed by Dr. Celso Gomez-Sanchez et al. [34] and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA). When indicated, proteins fused to fluorescent proteins were detected using a previously described polyclonal antibody raised in rabbit, kindly provided by Dr. Raimundo Freire (Hospital Universitario de Canarias, Canarias, Spain) [35]. To control for total protein loading we used monoclonal antibodies against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Abcam) or β -actin (Sigma). Secondary antibodies conjugated with peroxidase (GE Healthcare) were used at 1:10000 dilution. Western blots were developed with Immun-Star WesternC kit (Bio-Rad) and signals were detected with a Chemidoc imaging system (Bio-Rad) and quantified with the software provided by the manufacturer (Image Lab, Bio-Rad).

6

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

176 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

176 / 212

Cell imaging and kinetic analysis of nuclear translocation

Semiquantitative analysis of subcellular distribution in the absence of aldosterone was performed as previously described [36]. Briefly, cells were transfected with the indicated combination of plasmids, grown for 48 hours in culture medium supplemented with charcoal-stripped serum. Cells were then fixed, mounted, and images were taken under a confocal microscope. At least 75 cells per condition were scored into five categories (N, exclusive nuclear localization; N > C, predominant nuclear localization; N = C, even distribution throughout cytosol and nucleus; N < C, predominant cytosolic localization; C, exclusive cytosolic localization). Data are shown as the percentage of cells in each category from the total amount of cells scored. To detect MR-WT or HSD2-Flag constructs, cells were immunostained following previously published procedures [26] using a monoclonal antibody against the FLAG epitope (clone M2, Sigma) or a polyclonal antibody against MR (MR-H300, Santa Cruz Biotechnology) followed by incubation with goat anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies conjugated to Alexa fluor 488 or 594 (Invitrogen). Images were collected using a Fluoview 1000 confocal microscope (Olympus, Barcelona, Spain). Kinetic analysis of cortisol-induced MR nuclear translocation was performed as previously described [26, 37]. Briefly, cells were transfected with MR-147-GFP and grown for 48 hours in DMEM supplemented with charcoal-stripped fetal bovine serum. Cells were then transferred to extracellular saline (in mM: NaCl, 137; KCl, 4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1; glucose, 10; HEPES, 10; pH 7.4), placed under a Fluoview 1000 confocal microscope (Olympus) in a temperature-controlled environmental chamber set at 37°C and treated by adding 10 nM aldosterone to the medium. Images were collected for 1 hour at a sampling rate of one every 2 minutes. Quantitative analysis of MR-GFP distribution was performed frame-by-frame using the manufacturer's software (Olympus). Recordings in the absence of aldosterone were performed to control for photobleaching of GFP. Data processing and sigmoid curve-fitting were performed using Prism 5 (GraphPad) according to the following equation:

$$F = F_0 + \left[\frac{F_{max} - F_0}{1 + \exp\left(\frac{t_{1/2} - t}{V_n}\right)} \right]$$

7

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

177 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

177 / 212

where F_0 is the initial nuclear fluorescence, F_{max} is the maximal nuclear fluorescence reached, $t_{1/2}$ is the time (min) at which fluorescence is halfway between F_0 and F_{max} , and V_n is a factor determining how steeply nuclear accumulation changes with time.

In situ proximity ligation assay (PLA)

PLA was performed using a commercially available kit (Duolink, Olink Biosciences, Uppsala, Sweden) as recently described [25, 26]. 11 β -HSD2 SUMOylation was detected in COS-7 cells transfected with wild type or K266R HSD2-Flag and SUMO1-YFP by using a mouse monoclonal anti-Flag antibody (clone M2, Sigma) and a rabbit polyclonal anti-GFP kindly provided by Dr Raimundo Freire. MR nuclear interaction with SRC-1 coactivator was detected in COS-7 cells transfected with wild type MR and SRC-1-HA by using a mouse monoclonal anti-HA antibody (clone HA.11, Covance) and a rabbit polyclonal anti-MR (MR-H300, Santa Cruz Biotechnology). The antibodies used in the assay were previously validated by immunocytochemistry using previously described procedures [27, 36]. Specificity controls consisted on non transfected cells or omitting either one of the transfected plasmids (HSD2-FLAG or SUMO1-YFP), Results were quantified using the software provided by the manufacturer (Duolink Image Tool) and are expressed as average number of puncta/cell area.

Transactivation function assays

MR transcriptional activity was assayed by cotransfecting a plasmid encoding MR with a plasmid containing a synthetic promoter containing two copies of the basic hormone-responsive element (HRE) fused to the firefly luciferase gene (GRE2X-luc; kindly provided by Dr. Rainer Lanz, Baylor College of Medicine, Houston, TX) and a plasmid containing Renilla luciferase under the control of a cytomegalovirus promoter (pSG5-ren; kindly provided by Dr. Fátima Gebauer, Center for Genomic Regulation, Barcelona, Spain), as previously described [25, 26]. 11 β -HSD2 constructs were included in the transfection mix as indicated in each experiment. Total amounts of transfected DNA were kept constant. Cotransfected Renilla and firefly luciferase activities were measured sequentially using a commercially available kit (Dual-Glo, Promega). MR-dependent transcriptional activity was calculated as the ratio firefly luciferase/Renilla luciferase. Results are given as normalized average \pm SE. EC₅₀ values

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

were calculated from normalized data fitted to a log(agonist) versus response equation with variable slope using Prism 5.

11 β -HSD2 activity assays

11 β -HSD2 enzyme activity was determined by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using COS-7 cells transfected with wild type HSD2 or non-SUMOylatable mutant K266R. 24h after transfection cells were washed and transferred to charcoal-stripped serum-supplemented DMEM. Cells were treated with the indicated time and cortisol concentration. Cells were collected for protein assay by the method of Bradford and medium was used to extract steroids in ethyl acetate (HPLC grade). The organic layer was dried by heating at 60°C under a gas nitrogen current. Steroids were then diluted in a mobile phase of 30% acetonitrile to be analyzed by LC-MS/MS using a AB SCIEX seleXION mass spectrometer to obtain the absolute amount of cortisol and cortisone present in the medium. Negative control consisted on samples from non transfected cells run in parallel. Enzyme activity was calculated as pmol of cortisone accumulation normalized by time and total amount of protein. In certain experiments we express the data as percentage conversion of cortisol to cortisone. Data were fitted to a Michaelis-Menten equation using Prism 5 software (GraphPad Software).

Independently, 11 β -HSD2 activity was analyzed by measuring ³H-corticosterone conversion into ³H-11-dehydrocorticosterone by HPLC as described [38]. Data were analyzed by measuring the percentage conversion of cortisol to cortisone.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.). Unpaired Student *t* test, one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test, or two-parameter ANOVA followed by Bonferroni post test were applied as indicated in each Figure.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Results and Discussion

11 β -HSD2 is SUMOylated at lysine 266

We used the prediction algorithm GPS-SUMO [24] to investigate whether the human 11 β -HSD2 sequence displays any consensus SUMOylation sites. Results showed that lysine 266 is part of a high probability canonical SUMOylation motif. This lysine and the SUMO consensus motif are highly conserved in other mammals including primates, ruminants and rodents, but not pigs (Fig. 1). In addition to the canonical high probability covalent SUMOylation site surrounding K266, the algorithm predicted additional lower probability SUMOylation sites and SUMO interaction motifs (SIM), which may mediate non-covalent interaction with SUMO peptides (on-line supplemental information, Table S1).

We then sought to establish whether 11 β -HSD2 is SUMOylated *in vivo* at residue K266. To that end we co-transfected COS-7 cells with either FLAG-tagged wild type 11 β -HSD2 or nonSUMOylatable mutant K266R with a plasmid expressing YFP-SUMO1. After immunoprecipitation of 11 β -HSD2 with an anti-Flag antibody, we detected SUMO1-GFP by western blot. Results demonstrate a positive band migrating consistently with the predicted molecular mass of approximately 82.5 kDa (resulting from the mass of 11 β -HSD2, GFP and SUMO1, which are respectively 44, 27 and 11,5 kDa each). The intensity of this band was notably decreased in the case of K266R mutant (Fig. 2), demonstrating that the majority of the signal arises from SUMOylation at this residue. Interestingly, SUMOylation is not detected when total 11 β -HSD2 in the input sample is analyzed by western blot, suggesting that a low proportion of the protein is SUMOylated (Fig. 2). This is consistent with the general finding that the proportion of proteins modified by SUMO *in vivo* is very low, but the modification has a high functional impact, a phenomenon that has been termed the “SUMO paradox” [39].

In order to confirm 11 β -HSD2 and accurately quantify the extent of SUMOylation at residue K266 relative to the rest of the protein, we tested wild type or K266R 11 β -HSD2 SUMOylation by *in situ* proximity ligation assay (PLA) in COS-7 cells. First, we investigated 11 β -HSD2 subcellular localization of FLAG-tagged wild type or K266R HSD2. Immunostaining using anti-flag antibody shows the

10

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

180 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

180 / 212

previously described ER-associated localization of 11 β -HSD2 [40] for both HSD2 wild type and non-SUMOylatable mutant constructs, indicating that SUMOylation at residue K266 is not involved in the appropriate subcellular sorting of the enzyme (Fig. 3A). To quantitatively assess 11 β -HSD2 SUMOylation we used PLA cotransfecting FLAG-tagged wild type HSD2 or K266R and YFP-tagged SUMO-1 protein. We used monoclonal anti-Flag and polyclonal anti-YFP antibodies for PLA assay. Results show a prominent PLA signal indicating wild type 11 β -HSD2 SUMOylation in the cytosol, ER-associated region, even though most of SUMO-1 protein localizes in the nucleus (Fig. 3B). PLA signal of non-SUMOylatable mutant K266R was strongly reduced to approximately 25% of the wild type signal (Fig. 3B and C). Further proof of 11 β -HSD2 SUMOylation was obtained by using co-transfection of the well-known deSUMOylase SENP1 [41], PLA signal was drastically reduced by co-expression of SENP1 to approximately 20% of the signal (Fig. 3B and C). Non-transfected cells or omission of either one of the transfected plasmids resulted in the absence of signal (Fig. 3B and C). These results demonstrate 11 β -HSD2 SUMOylation, predominantly at K266 residue.

SUMOylation alters 11 β -HSD2 enzyme kinetics but not protein abundance

We next asked whether SUMOylation alters 11 β -HSD2 enzyme abundance or activity. To that end we transiently transfected wild type or mutant 11 β -HSD2 in COS7 cells and quantified protein expression by western blot. In addition to the K266R mutant, we included in the analysis two mutants that have been previously described as AME-producing mutations in humans, R213C and R337C. The former has been previously described as a loss-of-function mutation (PMID: 7670488), while the latter has been described to be a destabilized variant of the protein (PMID: 8733000; PMID: 17314322). Quantification of 11 β -HSD2 constructs showed that non-Sumoylatable mutant K266R did not produce any significant change in protein abundance when compared to wild type 11 β -HSD2 (Fig. 4). As expected, mutant R337C showed clearly diminished expression to approximately 20% of wild type level (Fig. 4).

In order to test whether mutation K266R alters or not 11 β -HSD2 activity, we measured conversion of cortisol to cortisone in intact cells by performing liquid chromatography coupled to mass spectrometry

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

(LC-MS/MS) to quantify both steroids in the culture medium. COS-7 cells were transfected with wild type 11 β -HSD2 or non-SUMOylatable mutant K266R and then incubated for the indicated time and cortisol concentration. First, we compared the time-dependent conversion of 300 nM cortisol to cortisone in non-transfected or HSD2-WT transfected cells (Fig. 5A). Results show a linear time-dependent cortisol conversion in cells transfected with wild type 11 β -HSD2 and a very slow conversion in non-transfected cells (lower than 1% in up to 4 hours treatment; Figure 5A). We then compared 11 β -HSD2-WT and non SUMOylatable mutant HSD2-K266R activity incubating 30 minutes with increasing cortisol concentration and fitting the data to a Michaelis-Menten curve (Fig. 5B). We calculated enzyme parameters K_m and V_{max} , obtaining a K_m of 563.4 nM for wild type and 375.9 for K266R mutant and a V_{max} of 573.5 pmol/hour/mg of protein for wild type and 394.9 for K266R mutant (Fig. 5B and C). The parameters calculated for wild type 11 β -HSD2 are consistent with previously published data [30, 42]. Non-SUMOylatable mutant K266R showed a 67% decrease in K_m and 69% decrease in V_{max} when compared to wild type HSD2. We checked the enzyme activity at 100 and 500nM cortisol concentration to represent physiological rates of cortisol previously assayed (Fig. 5B and D). At 100nM cortisol non-SUMOylatable mutant K266R shows higher activity (140%) while at 500nM cortisol there are no differences between both wild type HSD2 and K266R. In order to make sure that cofactor availability was not a limiting factor in COS-7 cells, we checked the enzyme activity reached at 100 and 500nM cortisol concentration with or without 2 mM cofactor addition to the medium. Results show that NAD addition is not necessary (Fig. 5E). In addition we performed western blot analysis to demonstrate that differences are not due to different 11 β -HSD2 construct expression (Fig. 5F and G).

We used an independent method to assess 11 β -HSD2 activity by measuring 3H -corticosterone conversion to 3H -11-dehydrocorticosterone by HPLC (Fig. 5H). COS-7 cells were treated with 10 nM 3H -corticosterone for 60 min and conversion to 3H -11-dehydrocorticosterone was measured and normalized to total protein content. Wild type HSD2 showed a 12.24% \pm 0.55 (average \pm SE, n=6) conversion, while HSD2-K266R showed a 12.72% \pm 0.43 conversion (n=6).

12

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

182 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Lack of SUMOylation at residue K266 allows cortisol-dependent MR nuclear translocation

To investigate whether K266 SUMOylation has a role on 11 β -HSD2 function preventing MR activation by circulating glucocorticoids, we first asked whether mutant K266R impairs 11 β -HSD2 ability to prevent cortisol-induced MR nuclear translocation. To that end we studied nuclear translocation of our fully functional fluorescent derivative MR, with YFP inserted after amino acid 147 [25-27], cotransfected or not with different HSD2 constructs fused to CFP (wild type HSD2; AME loss-of-function mutant R337C; and non SUMOylatable mutant K266R). The assay was performed in COS-7 cells, which lack detectable endogenous expression of 11 β -HSD2 (Figs. 2, 4 and 5). Transfected cells were left untreated or exposed overnight to two different physiological cortisol concentrations (100 or 500 nM). In the absence of ligand, MR localization is predominantly cytosolic in most (> 80%) of cells (Fig. 6A and B) as previously described in the same cell line [43]. Cotransfection with HSD2-WT, K266R or R337C did not alter naïve MR subcellular localization in the absence of cortisol (Fig. 6A and B). Overnight treatment with 100 nM cortisol stimulated full MR translocation to the nucleus (> 90% of cells). As expected, 11 β -HSD2-WT coexpression disturbed MR translocation, keeping a predominantly cytosolic MR localization, consistent with the cortisol-removal function of the enzyme (Fig. 6C and D). Cotransfection of 11 β -HSD2-R337C construct restored cortisol-induced MR translocation (Fig. 6C and D), consistent with the loss-of-function effect previously described for this AME mutant [29]. Non SUMOylatable mutant 11 β -HSD2-K266R coexpression was also incapable to prevent MR nuclear translocation, behaving like the loss-of-function mutant R337C (Fig. 6C and D). In order to check 11 β -HSD2 capacity to remove cortisol at higher concentration, we studied MR nuclear translocation with 500 nM cortisol treatment overnight, resulting in MR full nuclear translocation in all conditions (Fig. 6E and F). This result demonstrates that 11 β -HSD2 capacity to remove cortisol is limited and can be exceeded by high cortisol levels at the high end of the physiological range, an effect which has been suggested previously [38].

Lysine residues are the target of other post-translational modifications in addition to SUMOylation, including acetylation or ubiquitination. In order to check whether non-SUMOylatable K266R mutant effect at 100nM cortisol is specific of SUMOylation and not due to impairing of other modifications or

13

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

183 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

183 / 212

induction of a structural defect in the enzyme due to the mutation, we tested MR nuclear translocation coexpressing HSD2-WT with deSUMOylase SENP-1. This experiment also resulted in full cortisol-induced MR translocation, consistent with a SUMOylation-mediated effect on the ability of 11 β -HSD2 to prevent cortisol access to MR (Fig. 6G and H).

We next investigated the kinetics of cortisol-induced nuclear translocation in living COS-7 cells by imaging MR subcellular dynamics for the first hour after 100 nM cortisol addition. We ran time-lapse experiments in cells co-transfected with MR-147-GFP with or without wild type HSD2, AME mutant R337C or non-SUMOylatable mutant K266R. All 11 β -HSD2 constructs used were CFP-tagged. Images were taken every two minutes up to 60 minutes after ligand addition and the ratio of nuclear MR was calculated for every frame. Full cortisol-dependent MR nuclear translocation was achieved approximately 50 minutes after ligand addition (Fig. 7A and B). As expected, wild type HSD2 prevented nuclear import (< 10% of the receptor translocated over the time period). MR translocation in the presence of AME mutant R337C or non-SUMOylatable mutant K266R, was indistinguishable from the control MR condition (Fig. 7A and B). These data are consistent with subcellular localization after overnight treatment (Fig. 6C and D), suggesting that 11 β -HSD2 activity and its ability to prevent cortisol access to MR is regulated by SUMOylation of lysine 266.

11 β -HSD2 SUMOylation affects cortisol- but not aldosterone-dependent MR transcriptional response

We then tested whether MR-mediated gene transactivation is affected by 11 β -HSD2 SUMOylation. MR activity was assessed by cotransfecting the receptor with a luciferase reporter gene under the control of a synthetic promoter containing two copies of the hormone response element (HRE) in COS-7 cells. We treated cells overnight with increasing doses of cortisol (10 pM – 1 μ M) in the presence or absence of the different 11 β -HSD2 constructs. MR cortisol-dependent transactivation curve showed an EC₅₀ of 40 nM (Fig. 8A). AME mutants HSD2-R337C or R213C did not alter cortisol apparent affinity for MR, presenting an EC₅₀ of 32-44 nM, as expected for loss-of-function constructs. The presence of HSD2-WT produced the expected decrease in MR apparent affinity, with an EC₅₀ of approximately 2 μ M, two orders of magnitude higher than cortisol EC₅₀ for MR-WT. Surprisingly, non-SUMOylatable mutant HSD2-

14

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

184 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

K266R also decreased activity and apparent affinity ($EC_{50} = 1.4 \mu\text{M}$), behaving like the functional HSD2-WT (Fig. 8A). Western blot analysis showed that results of activity assays are not due to impaired MR expression (Fig. 8C and D).

Taking into consideration the experiments described above, it is clear that 11 β -HSD2-K266R decreases activity of MR at cortisol concentrations where full receptor translocation was demonstrated (Fig. 6 and 7), suggesting an impairment of cortisol-induced receptor activation in the presence of 11 β -HSD2-K266R. We next asked whether this functional impairment is ligand-dependent. To that end, we tested aldosterone-dependent MR transactivation with the different HSD2 constructs (Fig. 8B). All dose-response curves were superimposed, with an EC_{50} between 0.07 and 0.16 nM, as expected for aldosterone [28]. This result demonstrates that 11 β -HSD2-K266R does not impede *per se* MR activation, but rather prevents the activity of the receptor previously translocated by cortisol.

11 β -HSD2 SUMOylation affects cortisol- but not aldosterone-dependent recruitment of co-activators to MR

To gain insight into the mechanism by which in the presence of 11 β -HSD2-K266R prevents cortisol-induced but not aldosterone-induced MR transactivation, we tested the interaction between MR and steroid receptor co-activator 1 (SRC-1), a well-known co-activator of MR activity [44]. We cotransfected COS-7 cells with MR-WT and SRC1-HA. SRC-1 displays a predominantly nuclear localization both in control and cortisol-stimulated conditions, whereas MR shows the expected ligand-induced trafficking from cytosol to nucleus (Fig. 9A). To quantitatively assess MR-SRC-1 interaction we used PLA coexpressing CFP-tagged 11 β -HSD2-WT or K266R mutant. Results show a prominent PLA signal in the nucleus when MR is cotransfected with SRC-1 and nuclear translocation is promoted by cortisol (Fig. 9B). PLA signal was drastically reduced to ~ 40% by co-expression of either WT or K266R 11 β -HSD2 (Fig. 9B and C). Non-transfected cells or omission of either one of the transfected plasmids resulted in the absence of signal (Fig. 9B and C). These results demonstrate that efficient interaction of MR with SRC-1 is impaired not only by presence of active 11 β -HSD2 (which decreases nuclear translocation) but also by

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

the non SUMOylatable mutant K266R, suggesting a connection between MR and 11 β -HSD2 where lack of SUMOylation allows nuclear translocation but impairs the proper MR conformation necessary to recruit transcriptional co-activators. To explain that aldosterone-dependent transcriptional activity is not affected, we suggest that aldosterone ability to stabilize the ligand binding domain of the receptor is enough to allow the correct conformational change, whereas cortisol is unable due to the higher off-rate previously reported [38].

Taken together, our data demonstrate that non-SUMOylatable mutant HSD2-K266R is able to promote MR nuclear translocation, but even though a significant amount of receptor is translocated toward the nucleus, cortisol-dependent transcriptional activity is impaired. We suggest that 11 β -HSD2 must be interacting directly or indirectly with MR, allowing a cortisol-mediated conformational change of the receptor that participates in its activation and depends on 11 β -HSD2 modification by SUMOylation.

Our data demonstrate that the effect of mutation K266R on 11 β -HSD2 activity is mild, particularly at physiological cortisol concentrations. This is hard to reconcile with data showing full nuclear translocation but diminished MR activity. One possible explanation could be based on the proposed physical interaction between MR and 11 β -HSD2, previously suggested in the literature [40]. This hypothesis implicates that adequate interaction between MR and 11 β -HSD2 is necessary for the correct cortisol-induced conformational change of the receptor required to recruit transcriptional co-activators. In the absence of SUMOylation, this interaction would not be productive, decreasing MR transcriptional efficiency, but increasing its ability to translocate to the nucleus. Based on this idea, we checked whether we could detect direct interaction between MR with 11 β -HSD2 by PLA, but the results were negative (data not shown). This suggests that MR and 11 β -HSD2 do not closely interact in the cell, although the result does not preclude the possibility that both proteins are part of a larger complex and that SUMOylation of 11 β -HSD2 alters the nature of it.

In summary, we have shown that 11 β -HSD2 is SUMOylated and that this modification mainly takes place at residue K266. 11 β -HSD2 SUMOylation does not affect enzyme activity but alters its ability to prevent

16

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

186 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

cortisol-induced MR nuclear translocation. Interestingly, cortisol-translocated MR displays lower activity, due at least in part to impaired co-activator recruitment.

17

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

187 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

187 / 212

References

1. Chapman, K., M. Holmes, and J. Seckl, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(3): p. 1139-206.
2. Funder, J.W., et al., *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated*. *Science*, 1988. **242**(4878): p. 583-5.
3. Monder, C. and P.C. White, *11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. *Vitam Horm*, 1993. **47**: p. 187-271.
4. Naray-Fejes-Toth, A., C.O. Watlington, and G. Fejes-Toth, *11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the renal target cells of aldosterone*. *Endocrinology*, 1991. **129**(1): p. 17-21.
5. Alvarez de la Rosa, D., et al., *Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels*. *Annu Rev Physiol*, 2000. **62**: p. 573-94.
6. Arriza, J.L., et al., *Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor*. *Science*, 1987. **237**(4812): p. 268-75.
7. Alnemri, E.S., et al., *Overexpression and characterization of the human mineralocorticoid receptor*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(27): p. 18072-81.
8. Hurley, D.M., et al., *Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(2): p. 680-6.
9. Ferrari, P., *The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1802**(12): p. 1178-87.
10. White, P.C., T. Mune, and A.K. Agarwal, *11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(1): p. 135-56.
11. Mune, T., et al., *Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. *Nat Genet*, 1995. **10**(4): p. 394-9.

18

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

188 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

188 / 212

12. Stewart, P.M., et al., *Mineralocorticoid activity of liquorice: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age*. Lancet, 1987. **2**(8563): p. 821-4.
13. Watson, B., Jr., et al., *Genetic association of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD11B2) flanking microsatellites with essential hypertension in blacks*. Hypertension, 1996. **28**(3): p. 478-82.
14. Poch, E., et al., *Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms*. Hypertension, 2001. **38**(5): p. 1204-9.
15. Mariniello, B., et al., *Analysis of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene (HSD11B2) in human essential hypertension*. Am J Hypertens, 2005. **18**(8): p. 1091-8.
16. Lovati, E., et al., *Molecular basis of human salt sensitivity: the role of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(10): p. 3745-9.
17. Carvajal, C.A., et al., *Biochemical and genetic characterization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in low-renin essential hypertensives*. J Hypertens, 2005. **23**(1): p. 71-7.
18. Alikhani-Koupaei, R., et al., *Identification of polymorphisms in the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene promoter: functional characterization and relevance for salt sensitivity*. FASEB J, 2007. **21**(13): p. 3618-28.
19. Agarwal, A.K., et al., *CA-Repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2 : effects on gene expression and salt sensitivity*. Hypertension, 2000. **36**(2): p. 187-94.
20. Muller, S., et al., *SUMO, ubiquitin's mysterious cousin*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 202-10.
21. Galanty, Y., et al., *Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks*. Nature, 2009. **462**(7275): p. 935-9.
22. Werner, A., A. Flotho, and F. Melchior, *The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase*. Mol Cell, 2012. **46**(3): p. 287-98.
23. Rajan, S., et al., *Sumoylation silences the plasma membrane leak K+ channel K2P1*. Cell, 2005. **121**(1): p. 37-47.

19

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

189 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

189 / 212

24. Zhao, Q., et al., *GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Web Server issue): p. W325-30.
25. Jimenez-Canino, R., M.X. Fernandes, and D. Alvarez de la Rosa, *Phosphorylation of Mineralocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Impairs Receptor Activation and Has a Dominant Negative Effect over Non-phosphorylated Receptors*. J Biol Chem, 2016. **291**(36): p. 19068-78.
26. Jimenez-Canino, R., et al., *Histone Deacetylase 6-Controlled Hsp90 Acetylation Significantly Alters Mineralocorticoid Receptor Subcellular Dynamics But Not its Transcriptional Activity*. Endocrinology, 2016. **157**(6): p. 2515-32.
27. Aguilar-Sanchez, C., et al., *Identification of permissive insertion sites for generating functional fluorescent mineralocorticoid receptors*. Endocrinology, 2012. **153**(7): p. 3517-25.
28. Fagart, J., et al., *Antagonism in the human mineralocorticoid receptor*. EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3317-25.
29. Ferrari, P., et al., *The 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme: biochemical consequences of the congenital R337C mutation*. Steroids, 1996. **61**(4): p. 197-200.
30. Mune, T. and P.C. White, *Apparent mineralocorticoid excess: genotype is correlated with biochemical phenotype*. Hypertension, 1996. **27**(6): p. 1193-9.
31. Ayaydin, F. and M. Dasso, *Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogs*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5208-18.
32. Cheng, J., et al., *SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia*. Cell, 2007. **131**(3): p. 584-95.
33. Ou, X.M., et al., *Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 14299-307.
34. Gomez-Sanchez, C.E., et al., *Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1343-8.

20

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

190 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

35. Refolio, E., et al., *The Ddc2/ATRIP checkpoint protein monitors meiotic recombination intermediates*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 14): p. 2488-500.
36. Hernandez-Diaz, I., et al., *The mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive nuclear localization signals*. Endocrinology, 2010. **151**(8): p. 3888-99.
37. Gravez, B., et al., *The diuretic torasemide does not prevent aldosterone-mediated mineralocorticoid receptor activation in cardiomyocytes*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73737.
38. Lombes, M., et al., *The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. Endocrinology, 1994. **135**(3): p. 834-40.
39. Hay, R.T., *SUMO: a history of modification*. Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 1-12.
40. Odermatt, A., P. Arnold, and F.J. Frey, *The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28484-92.
41. Shi, T., et al., *Exploring the desumoylation process of SENP1: a study combined MD simulations with QM/MM calculations on SENP1-SUMO1-RanGAP1*. J Chem Inf Model, 2013. **53**(9): p. 2360-8.
42. Atanasov, A.G., et al., *Impaired protein stability of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2: a novel mechanism of apparent mineralocorticoid excess*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1262-70.
43. Fejes-Toth, G., D. Pearce, and A. Naray-Fejes-Toth, *Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 2973-8.
44. Amazit, L., et al., *Finerenone Impedes Aldosterone-dependent Nuclear Import of the Mineralocorticoid Receptor and Prevents Genomic Recruitment of Steroid Receptor Coactivator-1*. J Biol Chem, 2015. **290**(36): p. 21876-89.

21

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

191 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

191 / 212

Figure legends

Figure 1. Prediction of SUMOylation sites in 11 β -HSD2 by *in silico* tool. Alignment of sequences around the highly-conserved lysine 266 (human). *, residue conserved in all species; :, positions with conservative amino acid substitutions; ., partially conserved residues.

Figure 2. 11 β -HSD2 is modified by SUMOylation. Western blot analysis of FLAG-tagged HSD2 and SUMO-1-GFP immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. Negative control consisted on omission of 11 β -HSD2 in the transfection mix. Cell lysates were analyzed in the same blot consecutively probed with anti-11 β HSD2 and anti-GAPDH antibodies. After anti-FLAG immunoprecipitation, blot was probed with anti-GFP antibody to detect YFP-SUMO. *NT*, non-transfected cells. *Arrowheads* mark the migration of molecular mass markers (values in kDa).

Figure 3. 11 β -HSD2 SUMOylation occurs mainly at residue K266. A) Subcellular localization of FLAG-tagged wild type HSD2 and non-SUMOylatable mutant K266R. B) Representative images of proximity ligation assay results examining the interaction of FLAG-tagged 11 β -HSD2-WT or non-SUMOylatable mutant K266R with YFP-SUMO1 in the absence or presence of deSUMOylate SENP1. C) Quantitative analysis of PLA signals. Bars represent the average number of puncta/cell area \pm S.E. (n = 20 cells per condition). Negative controls consisted on analysis of non-transfected cells or leaving out either 11 β -HSD2-WT or YFP-SUMO1 from the transfection mix. ***, p < 0.001, one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test.

Figure 4. 11 β -HSD2-K266R mutant has normal protein abundance. A) Representative western blot of 11 β -HSD2 expression in COS-7 cells. *NT*, non transfected cells. The same blot was consecutively probed with anti-11 β HSD2 and anti-GAPDH antibodies. *Arrowheads* mark the migration of molecular mass markers (values in kDa). B) Quantitative analysis of western blots detecting expression of 11 β -HSD2 variants. Bars represent the average \pm SE of three independent experiments. *, p < 0.05, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test.

22

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

192 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

192 / 212

Figure 5. Non-SUMOylatable mutant K266R alters 11 β -HSD2 enzyme kinetics. COS-7 cells were transfected with wild type 11 β -HSD2 or non-SUMOylatable mutant K266R. After 24h in charcoal-stripped serum-supplemented DMEM, cells were treated with indicated time and cortisol concentration. Steroids in culture medium were quantified by LC-MS/MS . A) Percentage conversion of 300 nM cortisol to cortisone in non-transfected cells (N.T.) or in cells transfected with wild type 11 β -HSD2. Linear regression was used to fit data points to a linear equation. B) Wild type and mutant 11 β -HSD2 enzyme kinetics. Transfected cells were treated with increasing cortisol concentrations for 30 min. Data points represent average values \pm SE (N = X) and were fitted to the Michaelis-Menten equation. C) Michaelis-Menten parameters obtained from data fitting in panel B. D) Enzyme activity in transfected COS-7 cells treated with 100 or 500nM cortisol concentration. E) Enzyme activity in transfected COS-7 cells supplemented with 2 mM NAD and treated with 100 or 500nM cortisol concentration. F) Western blot analysis of 11 β -HSD2 expression in COS-7 cells used for enzyme activity determinations. *NT*, non transfected cells. The same blot was consecutively probed with anti-11 β -HSD2 and anti- β -actin antibodies. *Arrowheads* mark the migration of molecular mass markers (values in kDa). G) Quantitative western blotting analysis showing no changes in HSD2 expression of the different constructs transfected. *, $p < 0.05$, unpaired t student test. H) Quantitative HPLC-based analysis of 3 [H]-cortisol conversion to 3 [H]-cortisone in transfected COS-7 cells.

Figure 6. 11 β -HSD2 SUMOylation impairs its ability to prevent cortisol-induced MR nuclear translocation. A) Quantitative analysis of MR-147-YFP subcellular localization in COS-7 cells expressed alone or cotransfected with 11 β -HSD2 wild type, nonSUMOylatable mutant K266R or AME mutant R337C in the absence of ligand. Values represent the average percentage of cells in each category from the total amount of cells scored in three independent experiments (N, exclusive nuclear localization; N C, predominant nuclear localization; N C, even distribution throughout cytosol and nucleus; N C, predominant cytosolic localization; C, exclusive cytosolic localization). B) Representative images of untreated COS-7 cells transfected with the indicated constructs. C) Quantitative analysis of MR-147-YFP

23

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

193 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

subcellular localization in COS-7 cells after overnight treatment with 100 nM cortisol. Note that expression of wild type 11 β -HSD2 greatly diminished nuclear translocation, while AME mutant R337C or non-SUMOylatable mutant K266R were incapable of preventing cortisol-induced translocation. D) Representative images of COS-7 cells transfected with the indicated constructs after 100 nM cortisol treatment. E) Quantitative analysis of MR-147-YFP subcellular localization in COS-7 cells after overnight treatment with 500 nM cortisol, showing full MR nuclear translocation independently of wild-type or mutant 11 β -HSD2 expression. F Representative images of COS-7 cells transfected with the indicated constructs after 500 nM cortisol. G) Quantitative analysis of MR-147-YFP subcellular localization in COS-7 cells in the presence of 100nM cortisol and deSUMOylase SENP-1. H) Representative images of COS-7 cells transfected with the indicated constructs and treated with 100 nM cortisol.

Figure 7. Cortisol-induced MR nuclear translocation kinetic is not altered by non-SUMOylatable 11 β -HSD2-K266R. COS-7 cells were co-transfected with the indicated combinations of MR-GFP and wild type or 11 β -HSD2-CFP mutants. Untreated cells were placed under the confocal microscope in Ringer's medium and treated with 100 nM cortisol. A) Quantitative analysis of MR the time course of MR subcellular localization after cortisol addition (time 0). Images were recorded every two minutes. Nuclear vs. total fluorescence was calculated for 7-9 cells in each condition. Values represent average nuclear localization \pm SE. Data points were fitted to Boltzmann sigmoidal curves. B) Representative images of cortisol-induced MR nuclear translocation by 100nM cortisol. T, time in minutes after cortisol addition.

Figure 8. Cortisol-induced MR nuclear translocation results in impaired receptor activity in the presence of non-SUMOylatable 11 β -HSD2. COS-7 cells were co-transfected with the indicated combinations of MR-YFP and wild type or HSD2-CFP mutants, GRE2X-luciferase and CMV-*Renilla* reporters. After 24h in charcoal-stripped serum-supplemented DMEM, cells were treated or not with the indicated dose of cortisol (0.1 nM to 10 μ M) or aldosterone (0.01 nM to 1 μ M) overnight and firefly luciferase and *Renilla* luciferase activities were determined using the Dual-Glo kit (Promega). Cortisol

24

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

194 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

(A) or aldosterone (B)-induced promoter transactivation. Individual points represent the average \pm SE ($N = 3$) firefly/*Renilla* values normalized to the maximum activity in each construct. Data points were fitted to a variable slope model (four parameters). C) Representative western blots of MR expression in COS-7 cells. NT, non transfected cells. The same blot was consecutively probed with anti-MR and anti-GAPDH antibodies. *Arrowheads* mark the migration of molecular mass markers (values in kDa). D) Quantitative analysis of western blots detecting expression of MR. Bars represent the average \pm SE of three independent experiments. *, $p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test.

Figure 9. 11 β -HSD2- K266R expression impairs MR interaction with SRC-1 coactivator after cortisol treatment. COS-7 cells were co-transfected with the indicated combinations of MR-WT, SRC-1-HA and CFP tagged HSD2 constructs. A) Subcellular localization of MR-WT and HA-tagged SRC-1 before and after 100nM cortisol treatment. B) Representative images of proximity ligation assay results examining the nuclear interaction between MR and SCR-1 after 100nM cortisol treatment absence of 11 β -HSD2 or in the presence of CFP tagged 11 β -HSD2-WT or K266R mutant. PLA was performed with monoclonal anti-HA and polyclonal anti-MR antibodies. C) Quantitative analysis of PLA signals. Bars represent the average number of puncta/cell area \pm S.E. ($n = 20-25$ cells per condition). Negative controls consisted on analysis of non transfected cells, leaving out either MR-WT or SRC-1 from the transfection mix and omission of cortisol treatment. ***, $p < 0.001$, one-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test.

25

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

195 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

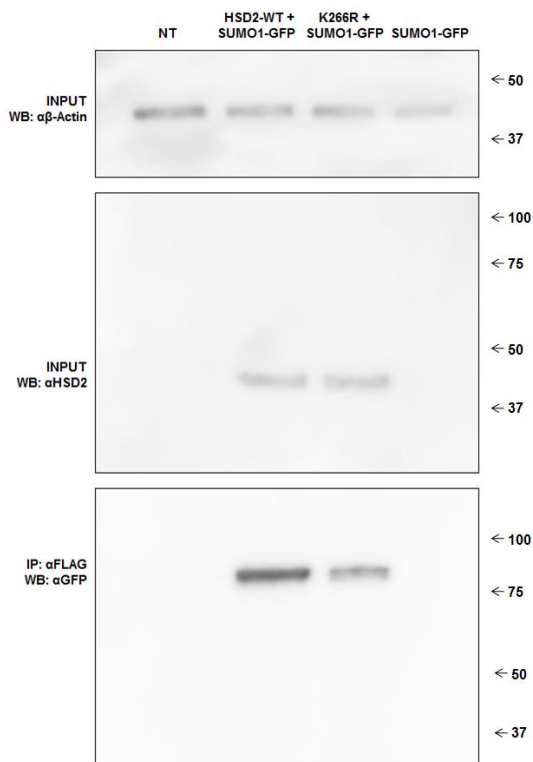
195 / 212

Figure 1.

```

HUMAN . . . . . AAVALLMDTFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
CHIMPANZEE . . . . . AAVALLMDTFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
MACAQUE . . . . . AAVALLMDTFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
SHEEP . . . . . AALALLMGNFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
BOVINE . . . . . AALALLMGNFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
MOUSE . . . . . AATALLMDTFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
RAT . . . . . AATALLMDTFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
PIG . . . . . AAVALLMDTFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
GUINEA PIG . . . . . AAVALLMDTFSCCELLPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 296
FROG . . . . . AALNRVMDIFRHELMPWGVKVIILPASYKTEGAHDNHIHWENQHKLLANLPQELLQAYG 300
ZEBRAFISH . . . . . AALNLFINTLRHELDPWGVKVSIIQPGCEKTESVNRVVGQWEKRRQLLLANLPQELLQAYG 285
** : . . : ** ** : * * . . : * : ** : : ** : : ** : : ** :
    
```

Figure 2.



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 14/02/2017 15:54:28
 En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 15/02/2017 15:41:59
 En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

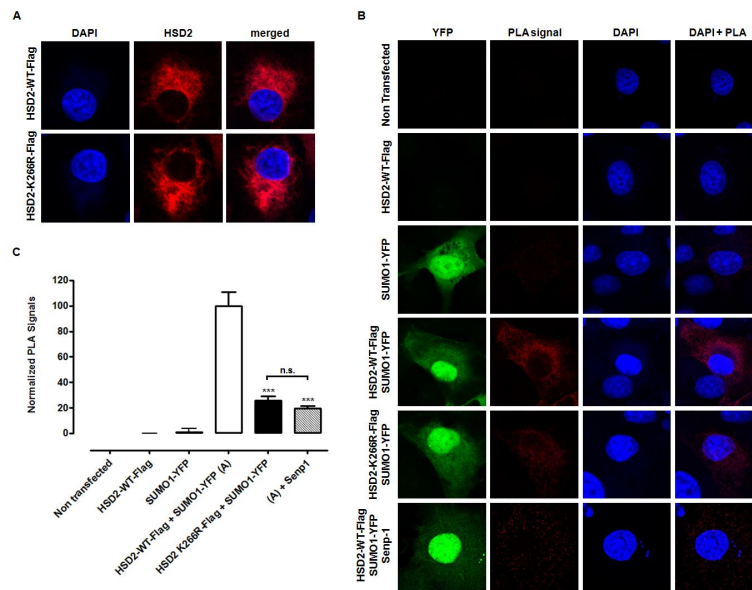
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 15/02/2017 21:26:03
 En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 16/02/2017 14:29:18
 En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Figure 3.



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO Fecha: 14/02/2017 15:54:28

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ 15/02/2017 15:41:59

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ 15/02/2017 21:26:03

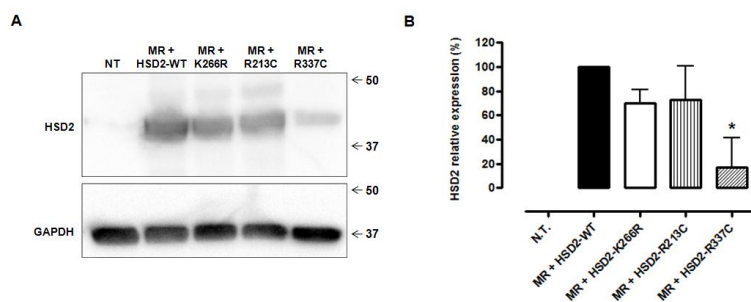
197 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Figure 4.



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: *UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA* Fecha: 14/02/2017 15:54:28
 En nombre de *RUBEN JIMENEZ CANINO*

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 15/02/2017 15:41:59
 En nombre de *DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ*

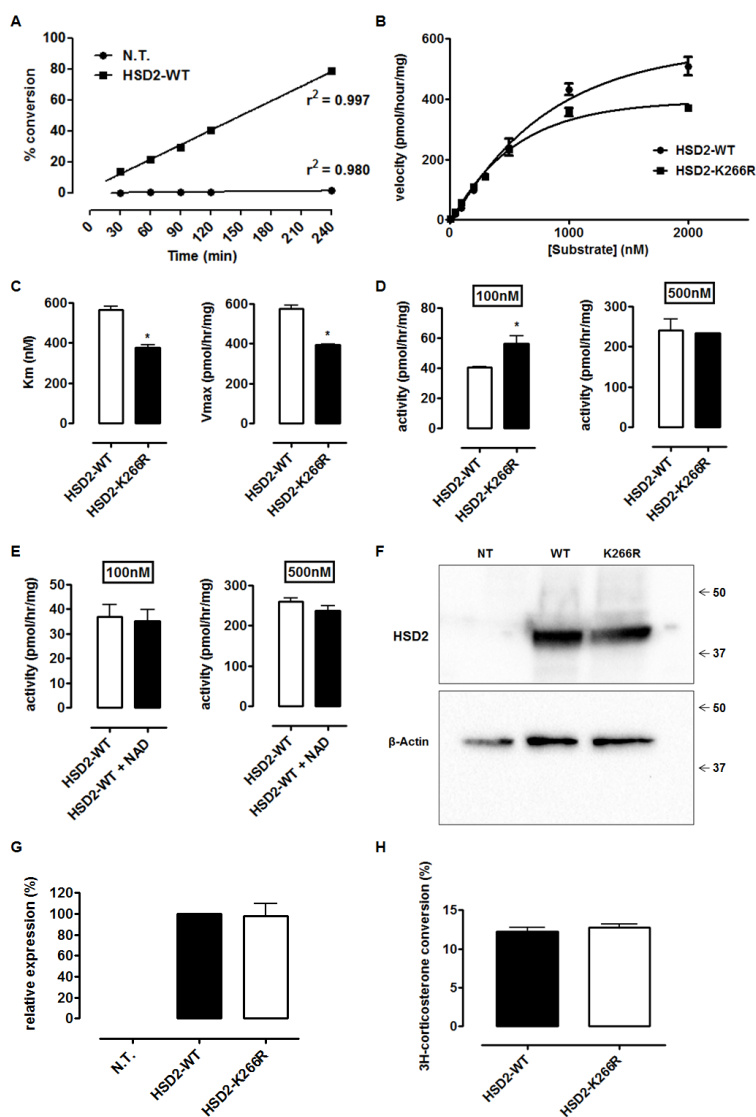
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 15/02/2017 21:26:03
 En nombre de *TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ*

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: *UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA* Fecha: 16/02/2017 14:29:18
 En nombre de *ERNESTO PEREDA DE PABLO*

Figure 5.



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

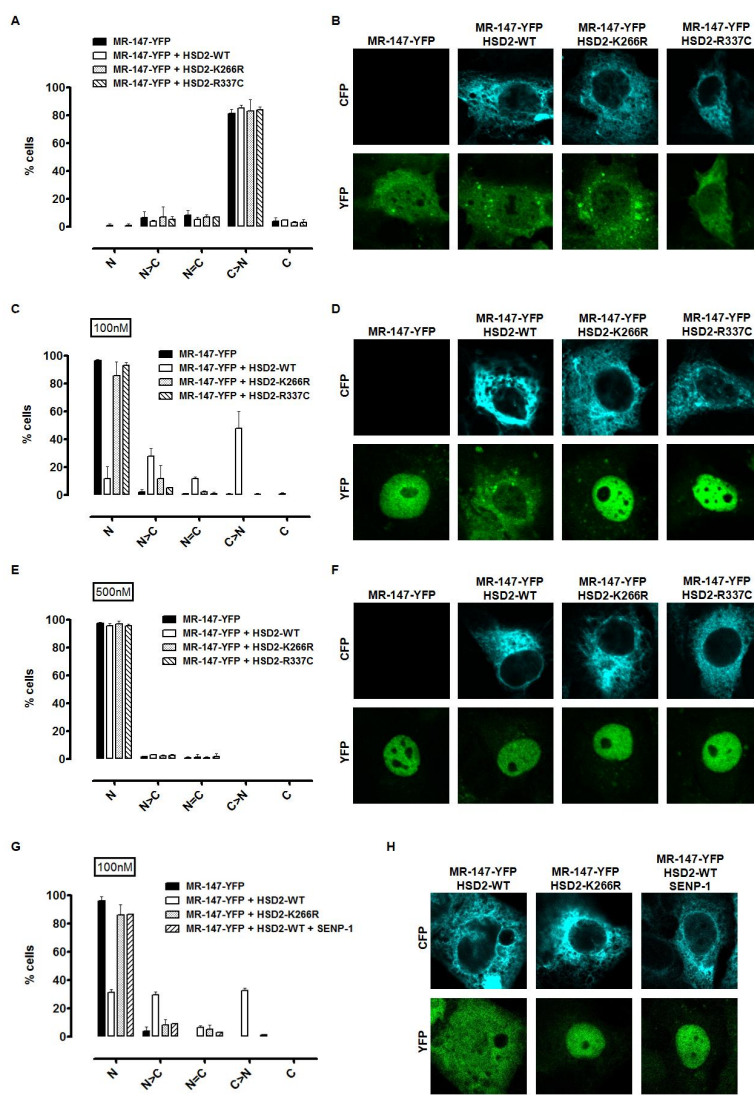
Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
 En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

Figure 6.



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 14/02/2017 15:54:28
 En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 15/02/2017 15:41:59
 En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ

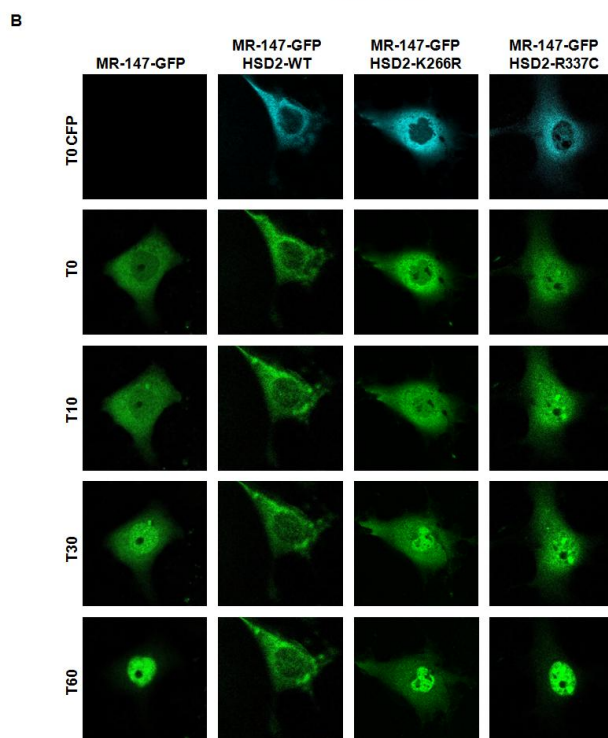
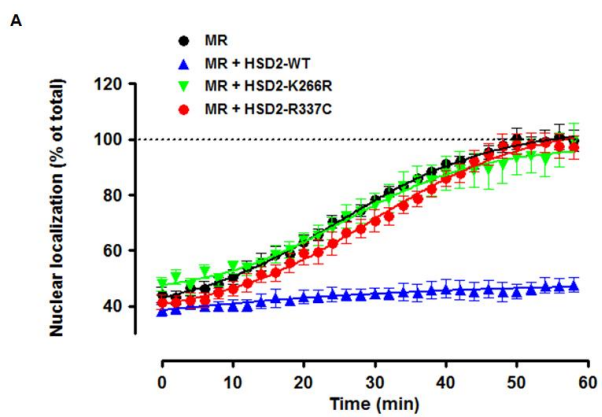
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA 15/02/2017 21:26:03
 En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA Fecha: 16/02/2017 14:29:18
 En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Figure 7.



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

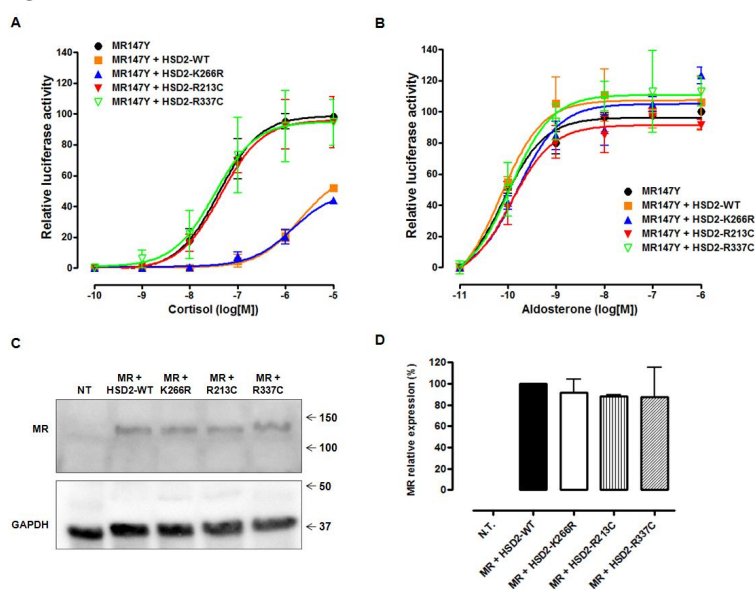
201 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

Figure 8.



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

202 / 212

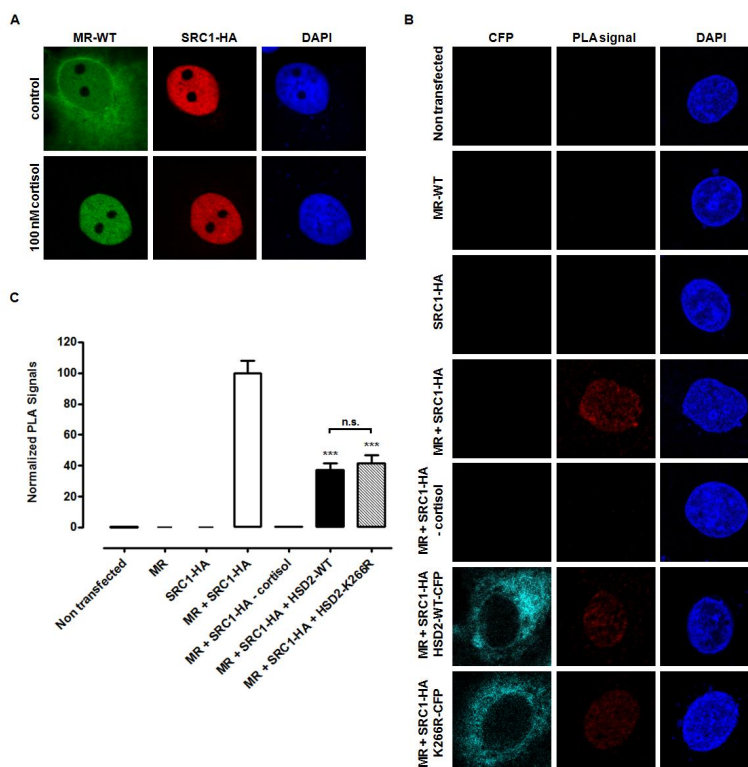
Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

202 / 212

Figure 9.



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

203 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18
---	----------------------------

On-line supplemental information:

Source	Position	Peptide	Score	P-value	Type
Human	214 - 218	IVTVG	36.995	0.089	Interaction
	266	FKTE	12.949	0.008	Consensus
Chimpanzee	214 - 218	IVTVG	36.995	0.089	Interaction
	266	FKTE	12.949	0.008	Consensus
Macaque	214 - 218	IVTVG	36.995	0.089	Interaction
	266	FKTE	12.949	0.008	Consensus
Sheep	214 - 218	IVTVS	41.304	0.055	Interaction
	266	FKTE	13.601	0.008	Consensus
Bovine	214 - 218	IVTVS	41.304	0.055	Interaction
	266	FKTE	13.601	0.008	Consensus
Mouse	58 - 62	LVVLA	44.461	0.036	Interaction
	214 - 218	IVTVG	40.651	0.06	Interaction
	266	FKTD	3.499	0.035	Consensus
Rat	58 - 62	LVVLA	44.461	0.036	Interaction
	214 - 218	IVTVG	40.651	0.06	Interaction
	266	FKTE	10.308	0.009	Consensus
Pig	58 - 62	LVVLA	42.61	0.043	Interaction
	214 - 218	IVTVG	39.887	0.065	Interaction
Guinea Pig	141	MKPE	10.094	0.013	Consensus
	266	FKTE	14.881	0.006	Consensus
Frog	136 - 140	LTHQ	37.222	0.132	Interaction
	218 - 222	IVTVG	42.654	0.047	Interaction
	262 - 266	ILILP	39.663	0.051	Interaction
Zebrafish	203 - 207	IVTIS	45.732	0.039	Interaction

Table S1. Predicted consensus SUMOylation sites and SUMO-interacting motifs (SIM) in different species. SUMOylation sites and SUMO-interacting motifs (SIM) predicted within 11 β -HSD2 sequence through the algorithm GPS-SUMO.

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

204 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

ANEXO 3: LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Anatomía y estructura del riñón. En detalle se muestra la disposición y estructura de las nefronas. Stuart Ira Fox (Fisiología Humana, 13ª edición 2014, McGraw-Hill).....	6
Figura 2: Estructura química del colesterol (C ₂₇ H ₄₆ O) a la izquierda, Pm = 385,65 g/mol; y de la aldosterona (C ₂₁ H ₂₈ O ₅) a la derecha, Pm = 360,44 g/mol.....	9
Figura 3: Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	11
Figura 4: Respuesta de una célula epitelial renal a la aldosterona. Modificado de Fuller y Young, 2005.....	17
Figura 5: Estructura del gen, mRNA y proteína MR, en la zona baja se representan residuos susceptibles de modificaciones post-traduccionales y regiones relacionadas con la importación y exportación nuclear. Viengchareun et al., 2007.....	19
Figura 6: Reacción irreversible de conversión de cortisol en cortisona catalizada por 11β-HSD2 mediante deshidrogenación del carbono 11.....	24
Figura 7: Tipos de modificaciones post-traduccionales proteicas.....	26
Figura 8: Estructura del LBD de MR con aldosterona unida. Se muestran los residuos probablemente importantes (izquierda). Detalle del sitio de unión al ligando y situación del residuo S839 (centro). Simulación de la fosforilación de S839 y su impacto en la conformación del sitio de unión (derecha).....	78
Figura 9: Modos vibracionales para MR nativo (izquierda), MR-S839D (centro) y MR-S839p (derecha).....	79
Figura 10: Primer modo vibracional para MR nativo (izquierda), MR-S839D (centro) y MR-S839p (derecha). El círculo blanco resalta la región que une las hélices H3 y H4 del LBD.	80

189

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

205 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

205 / 212

Tabla 1: Coactivadores de la actividad transcripcional de MR. Extraído de Yang et al., 2009.....22

Tabla 2: Correpresores de la actividad transcripcional de MR. Extraído de Yang et al., 2009.....23

Tabla 3: Constructos plasmídicos utilizados en las transfecciones39

Tabla 4: Mutantes generados, descripción funcional y cebadores empleados en su caso40

Tabla 5: Clonajes realizados, sitios de restricción y cebadores empleados en su caso41

Tabla 6: Anticuerpos primarios utilizados en los distintos inmunoensayos.....42

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

ANEXO 4: LISTA DE ABREVIATURAS

μM: Micromolar
 A: Alanina
 ACE: Enzima convertidora de angiotensina
 ACTH: Hormona adrenocorticotropa o corticotropina
 ADH: Hormona antidiurética o vasopresina
 AF: Dominio de transactivación
 AME: Síndrome de Exceso Aparente de Mineralocorticoides
 AMP: Adenosín monofosfato
 AMPc: AMP cíclico
 ANP: Péptido natriurético auricular
 AR: Receptor de andrógenos
 ATP: Adenosín trifosfato
 C: Cisteína
 cDNA: DNA complementario
 CFP: Proteína fluorescente cian
 CH₃CO: Grupo acetilo
 Cl⁻: Cloro
 CO₂: Dióxido de carbono
 CRH: Hormona liberadora de corticotropina
 D: Ácido aspártico
 DBD: Dominio de unión a DNA
 dm: doble mutante
 DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*
 DNA: Ácido desoxirribonucleico
 E: Ácido glutámico
 EC₅₀: Concentración efectiva media
 ENaC: Canal epitelial de sodio
 FBS: Suero fetal bovino
 GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
 GFP: Proteína fluorescente verde
 GMP: Guanosín monofosfato

191

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

207 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

207 / 212

GMPc: GMP cíclico
 GR: Receptor de glucocorticoides
 GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides
 GTP: Guanosín trifosfato
 H: Histidina
 H⁺: Protones
 HDAC: Histona desacetilasa
 hMR: MR humano
 HRE: Elemento de respuesta hormonal
 HPLC: LC de alta presión
 HSD2: 11-β-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa tipo 2
 HSP90: Proteína de choque térmico de 90 kDa
 IC₅₀: Concentración inhibitoria media
 K: Lisina
 K⁺: Potasio
 Kd: Constante de disociación
 kDa: Kilodalton
 Ki: Constante de inhibición
 Km: Constante de Michaelis
 LBD: Dominio de unión al ligando
 LC: Cromatografía líquida
 MR: Receptor de mineralocorticoides
 mRNA: RNA mensajero
 MS: Espectrometría de masas
 PIAS: Proteínas Inhibidoras de STAT Activado
 NLS: Secuencia de localización nuclear
 NTD: Dominio NH₂-terminal
 Na⁺: Sodio
 NaCl: Cloruro sódico
 NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido
 NGAL: Lipocalina 2
 nM: Nanomolar
 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
 PLA: Ensayo de ligación por proximidad

192

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

208 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

208 / 212

Pm: Peso molecular
 PO₄³⁻: Grupo fosfato
 PVDF: Polivinilideno fluoruro
 Q: Glutamina
 qPCR: PCR cuantitativa
 R: Arginina
 RNA: Ácido ribonucleico
 RT-PCR: PCR de transcripción inversa
 S: Serina
 SGK1: Quinasa inducida por suero y glucocorticoides 1
 siRNA: RNA interferente
 SDS: Dodecilsulfato sodico
 SDS-PAGE: Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
 SIM: Motivo de interacción con SUMO
 SRC: Coactivador de receptores de esteroides
 STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción
 SUMO: *Small ubiquitin-related modifier*
 TSA: Tricostatina A
 v_{max}: Velocidad máxima
 wt: *Wild type*
 YFP: Proteína fluorescente amarilla

193

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

209 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO	Fecha: 16/02/2017 14:29:18

209 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 858046	Código de verificación: 6SYt1hLi
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>RUBEN JIMENEZ CANINO</i>	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ</i>	15/02/2017 15:41:59
<i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ</i>	15/02/2017 21:26:03

210 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003 La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: http://sede.ull.es/validacion	
Identificador del documento: 859083	Código de verificación: 1FdrvOCS
Firmado por: <i>UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA</i> En nombre de <i>ERNESTO PEREDA DE PABLO</i>	Fecha: 16/02/2017 14:29:18



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

211 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

211 / 212



Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 858046 Código de verificación: 6SYt1hLi

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de RUBEN JIMENEZ CANINO	Fecha: 14/02/2017 15:54:28
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ	15/02/2017 15:41:59
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA En nombre de TERESA GIRALDEZ FERNANDEZ	15/02/2017 21:26:03

212 / 212

Este recibo incorpora firma electrónica de acuerdo a la Ley 59/2003
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <http://sede.ull.es/validacion>

Identificador del documento: 859083 Código de verificación: 1FdrvOCS

Firmado por: UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
En nombre de ERNESTO PEREDA DE PABLO

Fecha: 16/02/2017 14:29:18

212 / 212