

# NUEVAS ESTRATEGIAS DE VISUALIZACIÓN SUBCELULAR DE RECEPTORES HORMONALES



Autor: Juan Carlos Espinel Soto  
Tutor: Diego Álvarez de la Rosa  
Cotutor: Alejandro Cerrada de Dueñas



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 912338

Código de verificación: xhTRMEKd

Firmado por: JUAN CARLOS ESPINEL SOTO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2017/05/22 22:26:48

DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

2017/05/23 11:04:35

## ÍNDICE

<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>Hipótesis y objetivos concretos .....</b>	<b>6</b>
<b>Material y métodos .....</b>	<b>6</b>
<b>Plásmidos utilizados en este estudio .....</b>	<b>6</b>
<b>Purificación de plásmidos.....</b>	<b>7</b>
<b>Cultivos celulares y transfección de plásmidos .....</b>	<b>7</b>
<b>Marcaje con reactivo FlaSh.....</b>	<b>7</b>
<b>Preparación de las muestras para observación al microscopio confocal.....</b>	<b>8</b>
<b>Lisado celular y cuantificación de proteínas.....</b>	<b>8</b>
<b>Electroforesis de proteínas y análisis mediante Western Blot .....</b>	<b>9</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>10</b>
<b>Discusión y conclusiones .....</b>	<b>14</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>14</b>
<b>Anexo I Abreviaturas.....</b>	<b>14</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>15</b>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 912338

Código de verificación: xhTRMEKd

Firmado por: JUAN CARLOS ESPINEL SOTO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2017/05/22 22:26:48

DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

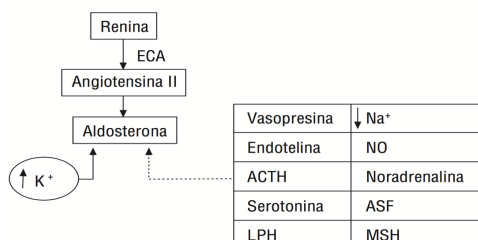
2017/05/23 11:04:35

## Abstract

Aldosterone plays an important role in the regulation of plasma  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  levels. This hormone interacts with a receptor from the nuclear receptor family, the mineralocorticoid receptor (MR). Ligand binding causes the translocation of MR-aldosterone to the nucleus, where it modulates the expression of certain genes. These genes are involved in the reabsorption of sodium and the excretion of potassium in the kidney. Apart from its physiological role, several studies have linked aldosterone with the development of cardiac, vascular and renal injury. This has led to the development of drugs that antagonize their action and delay organ damage in hypertensive patients. The objective of this project is to develop methods to study MR subcellular dynamics, specifically nuclear export. To do this we used cultured cells transfected with different plasmids allowing two visualization techniques: 1) tagging with a yellow fluorescent protein (YFP) and 2) using a fluorescein-derived reagent (FIAsH) that emits fluorescence when bound to specific sequences of a protein and allows to perform pulse-chase experiments. Cellular imaging was performed using confocal microscopy. We succeeded in detecting MR-YFP. However it was not possible to visualize FIAsH-tagged MR due to high levels of non-specific background. Our results show that MR constructs containing the tetracysteine motif to which FIAsH binds are not expressed in the same abundance as the native MR protein. Alternative visualization techniques will be needed to address MR nuclear export.

## Introducción

La aldosterona es una hormona que se sintetiza en la corteza de la glándula adrenal a partir del colesterol. La función de la aldosterona es la regulación de los niveles plasmáticos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  aumentando la secreción de  $\text{K}^+$  y la reabsorción de  $\text{Na}^+$  en la nefrona distal y el colon, tejidos donde se encuentran mayoritariamente sus receptores. La aldosterona es sintetizada en respuesta a varios estímulos, principalmente el aumento de concentración plasmática de  $\text{K}^+$  o angiotensina II (Silverthorn, 2009; Figura 1).

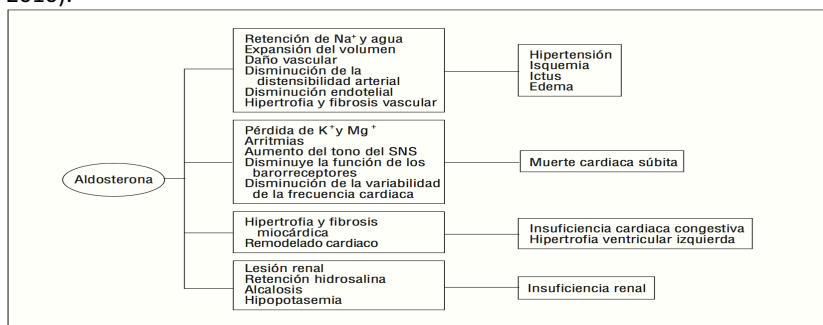


**Figura 1. Factores que controlan la liberación de aldosterona.**

ACTH: hormona adrenocorticotropa; ASF: factor estimulador de la aldosterona; ECA: enzima de conversión de la angiotensina; LPH: hormona lipolítica; MSH: hormona estimulante de melanocitos; NO: óxido nítrico (Núñez et al. 2006).

La regulación inadecuada de los niveles de aldosterona puede ser causa de diferentes patologías (Figura 2). Por ejemplo los pacientes con hiperaldosteronismo primario (Síndrome de Conn) presentan una hipertensión resistente a la mayoría de antihipertensivos e hipokalemia. Además, una elevada concentración de aldosterona en sangre tiene efectos cardio y nefrotóxicos, provocando mayor daño en estos

órganos comparado con la población hipertensa con otra etiología (Benavente et al. 2010).

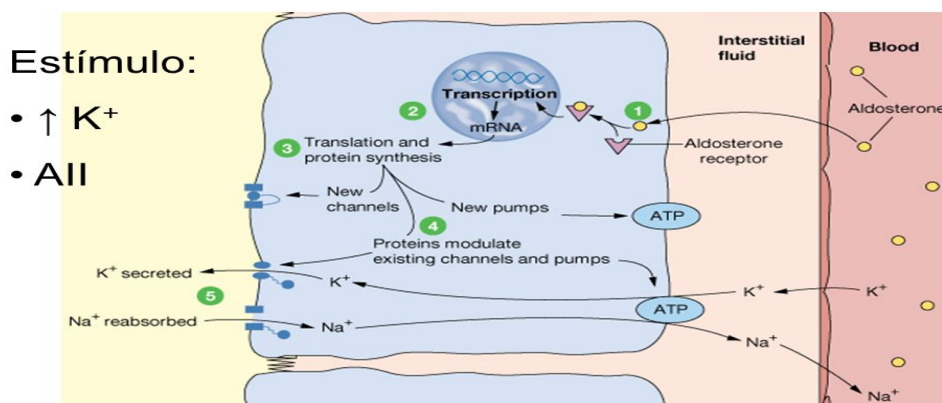


**Figura 2. Principales acciones fisiopatológicas de la aldosterona.**

SNS: sistema nervioso simpático (Núñez et al. 2006).

Los antagonistas de la aldosterona (espironolactona y eplerenona), conocidos como diuréticos ahorradores de  $K^+$  y que actúan inhibiendo el receptor de mineralocorticoides (MR), se utilizan cada vez más, en pacientes insuficiencia cardíaca para retrasar el remodelado cardíaco (Núñez et al. 2006).

El MR pertenece a la familia de receptores nucleares, factores de transcripción dependientes de ligando que regulan la expresión de determinados genes diana. Aunque la principal función fisiológica de MR se desarrolla en el riñón (Figura 3), se ha demostrado que MR se expresa en muchos otros tejidos y desarrolla importantes funciones relacionadas con la diferenciación y proliferación celular, además de la regulación del transporte iónico. Cuando la aldosterona interacciona con MR se produce la translocación del receptor al núcleo, dimerización con otro complejo MR-aldosterona e interacción con secuencias específicas de DNA en promotores de genes específicos, modulando la transcripción de los mismos. En el epitelio renal, estos genes codifican principalmente subunidades de canales de  $Na^+$  y  $K^+$ , la  $Na^+/K^+$ -ATPasa y proteínas reguladoras de estos sistemas de transporte (Viengchareun et al. 2007).



**Figura 3. Mecanismo de acción de la aldosterona en las células principales del riñón.** La aldosterona difunde al interior de la célula y se une a MR (1). El complejo aldosterona-MR comienza la translocación al núcleo y actúa como factor de transcripción (2), sintetizando nuevos canales iónicos y bombas (3) o proteínas reguladoras de los mismos (4). El resultado es el aumento de la reabsorción de  $Na^+$  y la excreción de  $K^+$  (5) (Silverthorn, 2009).

4

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 912338

Código de verificación: xhTRMEKd

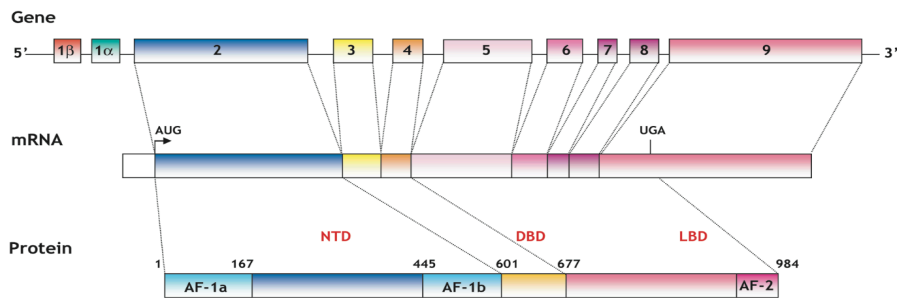
Firmado por: JUAN CARLOS ESPINEL SOTO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2017/05/22 22:26:48

DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

2017/05/23 11:04:35





**Figura 4. Representación esquemática de la estructura de MR humano.** El gen NR3C2 que codifica al receptor de mineralocorticoides humano (hMR) está localizado en el cromosoma 4 y se extiende aproximadamente 450 Kb. El gen está compuesto por 10 exones; los primeros dos exones, 1 $\alpha$  y 1 $\beta$ , no son traducidos, y los siguientes 8 exones son los que codifican los 984 aminoácidos de MR. MR tiene 3 dominios funcionales principales; un dominio N-terminal (NTD), seguido de un dominio central de unión a DNA (DBD), luego presenta una región bisagra que lo une con el extremo C-terminal que es el dominio de unión a ligando (LBD). El exón 2 codifica la mayor parte del NTD, los exones 3 y 4 para cada uno de los dos dedos de zinc de DBD, y los últimos 5 exones para el LBD. (Viengchareun et al. 2007).

Uno de los aspectos de la biología de MR que se desconoce hasta el momento es qué ocurre con él una vez que desaparece el estímulo hormonal y el receptor se encuentra en el núcleo. Es posible que MR se recicle, volviendo al citosol, o bien que se degrade en el núcleo. Esto es particularmente importante porque si MR una vez que desaparece la aldosterona permanece en el núcleo estaría siempre activado, ya que si bien necesita el estímulo de la hormona para actuar como factor de transcripción, la unión a los elementos reguladores de DNA es independiente de ligando. Por otro lado si se degrada en el núcleo, la célula tardaría un tiempo, hasta que volviese a sintetizar nuevos MR, en poder responder al estímulo de la aldosterona.

Existen varias técnicas que permiten estudiar la dinámica subcelular de MR mediante microscopía. Una opción consiste en la fusión de MR a proteínas fluorescentes (FP) derivadas de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*. Estas proteínas emiten fluorescencia sin necesidad de ningún cofactor y su señal tiene alta especificidad, ya que la FP está unida a la proteína a estudiar (MR). Un inconveniente es el elevado tamaño de las FP, que podría alterar la función de MR. Además, el uso de fusiones FP-MR codificadas genéticamente hace que la célula produzca constantemente nuevas proteínas fluorescentes, haciendo imposible distinguir si la fluorescencia citosólica proviene de proteínas de nueva síntesis o exportadas desde el núcleo.

Existen técnicas alternativas de marcaje, como el arseniato de fluoresceína (FIAsh). FIAsh es un reactivo que emite fluorescencia al unirse con alta afinidad a la secuencia tetracisteína (TC) CCXXCC (donde X es cualquier aminoácido; Figura 5). Para realizar esta técnica es necesario insertar el TC en MR. Las ventajas de esta técnica son el pequeño tamaño de la inserción y la posibilidad de realizar experimentos de pulso y caza, ya que podemos marcar una cantidad razonable de receptores que nos permita

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 912338

Código de verificación: xhTRMEKd

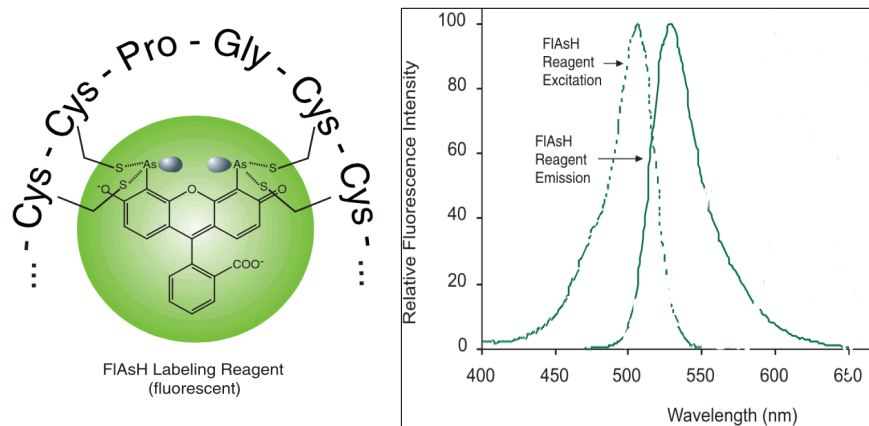
Firmado por: JUAN CARLOS ESPINEL SOTO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2017/05/22 22:26:48

DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

2017/05/23 11:04:35

seguir su actividad, retirar el reactivo y seguir el marcaje generado mediante microscopía (Martin et al. *Nature Biotechnology*, 2005).



**Figura 5. Representación esquemática de la unión de FIAsh a el motivo TC. Espectro de absorción y emisión del reactivo FIAsh.** Tiene un pico de absorción a 508 nm y un pico de emisión a 528 nm.

### Hipótesis y objetivos concretos

La hipótesis de este trabajo es que tras el cese del estímulo por aldosterona, MR se exporta desde el núcleo hasta el citosol. Para poder comprobar esta hipótesis, desarrollaremos los siguientes objetivos concretos:

1. comprobar si la utilización del sistema FIAsh nos permite visualizar MR en células en cultivo
2. si se cumple el objetivo 1, estudiar el exporte de MR fuera del núcleo tras adición y retirada de aldosterona.

### Material y métodos

#### Plásmidos utilizados en este estudio

Los plásmidos utilizados en este estudio estaban disponibles en el laboratorio y fueron:

1. pcDNA3.1-MR (MR-WT): contiene la secuencia de DNA complementario (cDNA) de MR de ratón (Hernandez-Diaz et al. *Endocrinology*, 2010).
2. pcDNA3.1-MR-147-YFP (MR-YFP): plásmido que contiene el cDNA de MR de ratón con una inserción de la proteína amarilla fluorescente (YFP) tras el aminoácido 147 de la secuencia de MR. Esta construcción produce un receptor fluorescente con funcionalidad conservada (Aguilar-Sanchez et al. *Endocrinology*, 2012). La secuencia codificante de YFP está flanqueada por sitios Ascl que permiten su sustitución por cualquier otra secuencia mediante técnicas estándar de biología molecular.
3. pcDNA3.1-MR-147-TC1 (MR-TC1): plásmido derivado del #2 donde se ha sustituido YFP por un motivo TC optimizado que permite la unión de FIAsh (HRWCCPGCCKTF; Martin et al. *Nature Biotechnology*, 2005).

4. pcDNA3.1-MR-147-TC2 (MR-TC2): plásmido derivado del #2 donde se ha sustituido YFP por otra secuencia TC optimizado diferente al anterior (FLNCCPGCCMEP; Martin et al. *Nature Biotechnology*, 2005).

#### Purificación de plásmidos

Los plásmidos se amplificaron en bacterias *E. coli* crecidas en medio Luria Bertani (LB; 10 g/l triptona; 5 g/l extracto de levadura; 10 g/l NaCl) con ampicilina (50 µg/ml). Se cultivaron las bacterias durante 24h a 37°C en 500 ml de medio para posteriormente purificar el DNA plasmídico utilizando el kit comercial *Nucleo Bond® Xtra EF plasmid purification*, que utiliza el método de la lisis alcalina. Para medir la pureza y la concentración de los plásmidos que obtuvimos usamos un espectrofotómetro Nanodrop midiendo absorbancia a 260 nm (pico de absorbancia del DNA), a 280 nm (pico de absorbancia de las proteínas) y a 230nm (valor relacionado con la presencia de sales en la muestra).

Resultados:

Plásmido	Abs 260/230	Abs 260/280	Concentración
TC1	2,05	1,88	283,3 ng/µl
TC2	1,94	1,81	435 ng/µl

**Tabla 1. Resultados de la concentración y pureza de los plásmidos obtenidos.** A partir de la Abs a 260 nm se obtiene la concentración de DNA de la muestra (conociendo que el coeficiente de extinción molar medio del DNA de doble cadena a 260 nm es de  $0.020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Los cocientes Abs 260/230 y Abs 260/280 nos da información acerca de la pureza. El ratio Abs 260/280 debe estar cercano a 1.8 para DNA. v el ratio Abs 260/230 debe estar entre 2 v 2.2.

Los plásmidos obtenidos los conservamos a -20°C.

#### Cultivos celulares y transfección de plásmidos

Usamos la línea celular HEK293T proveniente de tejido embrionario renal humano. Esta línea celular, a pesar de proceder de tejido renal, no expresa MR de forma natural. Las células fueron cultivadas en recipientes de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo utilizado fue el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células fueron transfectadas usando el reactivo Polyplus jetPRIME®, que forma micelas cargadas con el plásmido que se unen a la membrana de la célula y liberan su contenido en el citosol. Las transfecciones se realizaron en placas de 12 pocillos con un cubreobjetos circular en experimentos para microscopía, o bien en placas de 6 pocillos para obtener muestras para análisis de proteínas mediante western blot.

#### Marcaje con reactivo FlaSh

Usamos el kit comercial TC-FlAsHTM II In-Cell Tetracysteine Tag Detection Kit (Molecular Probes).

Componentes del Kit:

componente	Concentración	volumen
Reactivo de marcaje FIAsh-EDT <sub>2</sub>	2mM en DMSO	40µL
Tampón de lavado BAL	100x en ddH <sub>2</sub> O (25mM)	1,2mL

Para el experimento utilizamos cuatro condiciones: control positivo (MR-YFP); control negativo (células no transfectadas); células transfectadas con MR-TC1 o con MR-TC2. El reactivo de marcaje FIAsh-EDT<sub>2</sub> se diluyó 1:800 en medio salino (concentración final, 2,5 µM), añadiendo 400 µL a cada pocillo. Tras una incubación de 3 min a temperatura ambiente se realizaron 2 lavados con tampón BAL diluido 1x (300µL por lavado).

**Preparación de las muestras para observación al microscopio confocal.**

Una vez que las células habían sido lavadas se procedió a su observación al microscopio confocal. El microscopio está dotado de una cámara aislada que ajustamos a 37 °C, ya que previamente se ha comprobado en el laboratorio que a menor temperatura no ocurre translocación nuclear de MR. Con unas pinzas de precisión se retira el cubre sobre el que están las células y se coloca en el microscopio. Encima del cubre ponemos 1 ml de suero salino y añadimos 1µL de aldosterona 10 µM obteniendo una concentración final de 10 nM, concentración situada en el rango superior de la concentración fisiológica (0.1-10 nM). La longitud de onda de excitación fue de 508 nm y la de emisión 528 nm.

**Lisado celular y cuantificación de proteínas**

Tras la retirada del medio de cultivo, lavamos con tampón fosfato salino y añadimos 1 ml de tripsina (0,5g/L) para levantar las células. Pasados 5 minutos se inactivó la tripsina diluyéndola con medio DMEM y las células se recuperaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos en tubos cónicos de 15 ml. Resuspendimos el pellet en 50 µL de tapón de lisis TENT (50 mM Tris-HCl PH 7.5; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Tritón X-100) y 2µL de cóctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche). Incubamos 5 minutos y centrifugamos 10 minutos a 14000 xg para eliminar los restos celulares, conservando el sobrenadante con las proteínas solubilizadas. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su utilización el mismo día. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinónico (Reacción de Biuret), utilizando una recta de calibrado con concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino (BSA). La reacción se cuantificó en un lector de placas Benchmark Plus™ midiendo la absorbancia a 562 nm. Los datos de la recta patrón se utilizaron para obtener una ecuación mediante ajuste lineal y poder extrapolar las concentraciones de las muestras problema.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 912338

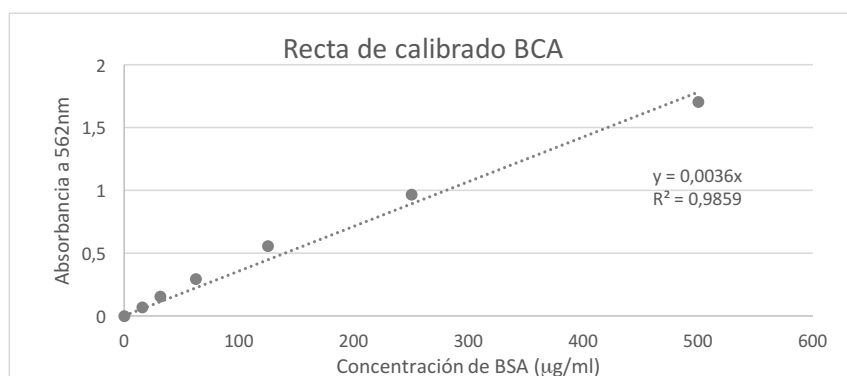
Código de verificación: xhTRMEKd

Firmado por: JUAN CARLOS ESPINEL SOTO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2017/05/22 22:26:48

DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

2017/05/23 11:04:35



**Gráfica 1. Recta de calibrado de BCA.** Se muestra una recta de calibrado representativa de las realizadas en este trabajo.

Muestra	Abs1	Abs2	Promedio	Promedio-blanco	conc µg/ml	Conc µg/µL
TC1	1,521	1,59	1,556	1,459	405,278	8,106
TC2	1,756	1,667	1,711	1,615	448,611	8,972
MR-WT	1,664	1,544	1,604	1,507	418,750	8,375
NT	1,816	1,47	1,643	1,547	429,583	8,592

**Tabla 2.** Se muestran las absorbancias de las muestras obtenidas en el lector de placas, el promedio de estas absorbancias, la corrección con el blanco y las concentraciones de las muestras obtenidas al sustituir en la ecuación de la recta  $Abs = 0,0036 \times \text{concentración}$ .

#### Electroforesis de proteínas y análisis mediante Western Blot

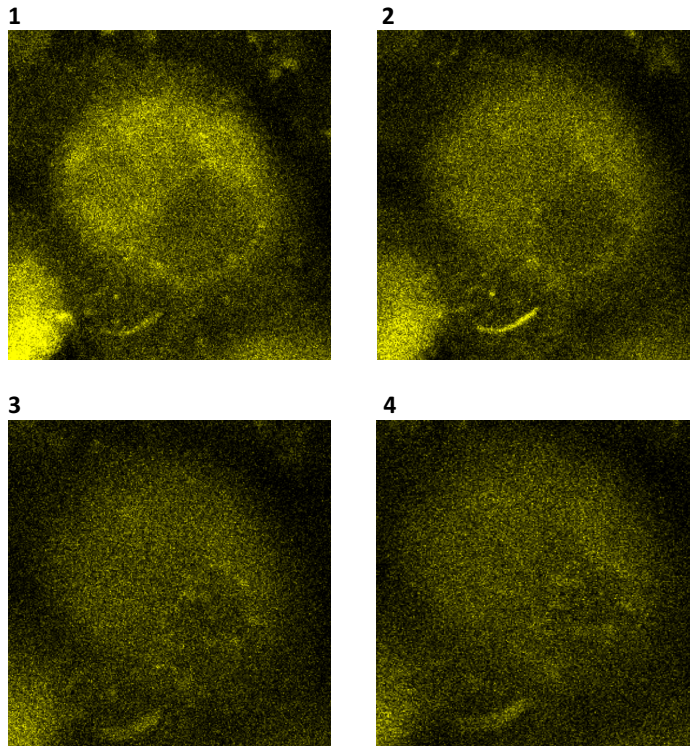
La separación de proteínas por peso molecular se realizó mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando el sistema *Mini-protean TGX Precast Gels* (Biorad), utilizándose 10 µg de cada muestra. Las electroforesis se realizaron a 120 voltios y se visualizaron las proteínas utilizando el sistema *Stain-free* (Biorad), consistente en la producción de fluorescencia mediante la reacción inducida por luz UV de un reactivo tri-halogenado presente en el gel con los residuos de triptófano presentes en las proteínas. La visualización de las proteínas se realizó en el sistema *ChemiDoc™ Touch Imaging System* (Biorad). A continuación se realizó una transferencia a membrana PVDF usando el sistema *Transblot turbo* (Biorad) a 1,3 amperios y 25 voltios durante 7 minutos. Para asegurarnos de que la transferencia había ido correctamente se comprobó la presencia de fluorescencia debida al sistema *Stain-free* utilizando el aparato *ChemiDoc™ Touch Imaging System*.

El análisis de la expresión de las proteínas derivadas de las construcciones de MR se realizó mediante western blot usando diferentes anticuerpos: anti MR H-300 (anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra los primeros 300 aminoácidos de MR; Santa Cruz Biotechnology); anti MR 2B7 (anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón contra los aminoácidos 64-82 de la secuencia de MR de rata; Gomez-Sanchez et al. *Endocrinology*, 2006); anti MR 1D5 (anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón

contra los aminoácidos 1-18 de la secuencia de MR de rata; Gomez-Sanchez et al. *Endocrinology*, 2006). Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo conjugados a peroxidasa (GE Healthcare). El revelado de las membranas se realizó utilizando el reactivo *Immun-Star* (Biorad) y el aparato de detección *Imagequant LAS 500* (GE Healthcare).

## Resultados

Como control positivo del procedimiento de transfección celular, registro de imágenes y traslocación nuclear inducida por aldosterona, se realizaron experimentos en células transfectadas con MR-YFP. A continuación se muestran imágenes obtenidas del microscopio confocal de estas células a las cuales se les añadió aldosterona y se tomaron imágenes cada 20 minutos.



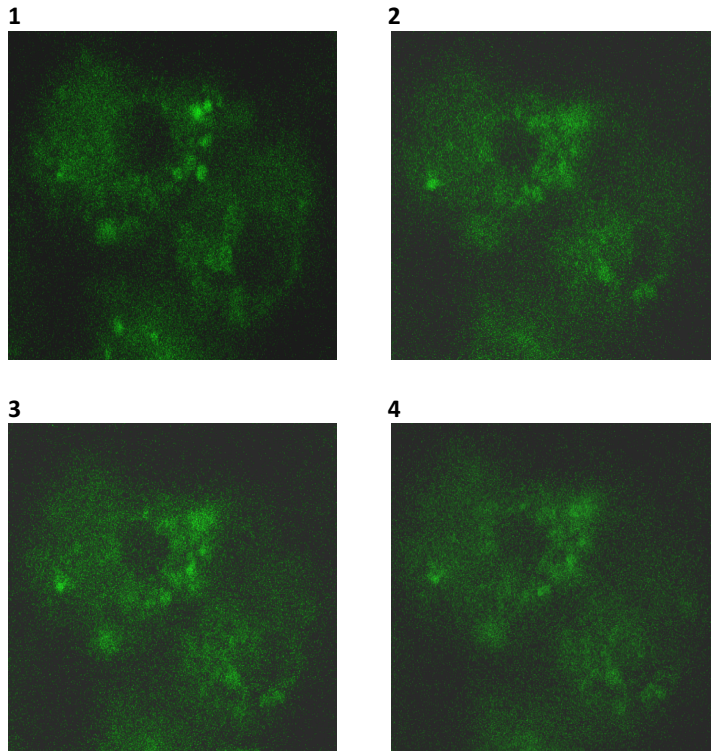
**Figura 6. Células transfectadas con MR-YFP.** Se muestran una secuencia de imágenes tomadas cada 20 minutos tras la adición de aldosterona. Se puede observar la translocación al núcleo.

Con estas imágenes (Figura 6) se comprueba que ha habido transfección, que MR es capaz de translocarse al núcleo y que el microscopio funciona adecuadamente.

A continuación se realizó un experimento en el que se transfectaron las construcciones MR-TC1 y MR-TC2 en células HEK293T y se realizó la tinción con el reactivo FIAH, con objeto de comprobar si esta aproximación produce señal de fluorescencia específica.



A continuación se muestra una serie de imágenes obtenidas con un microscopio confocal de células transfectadas con MR-TC2 (Figura 7).

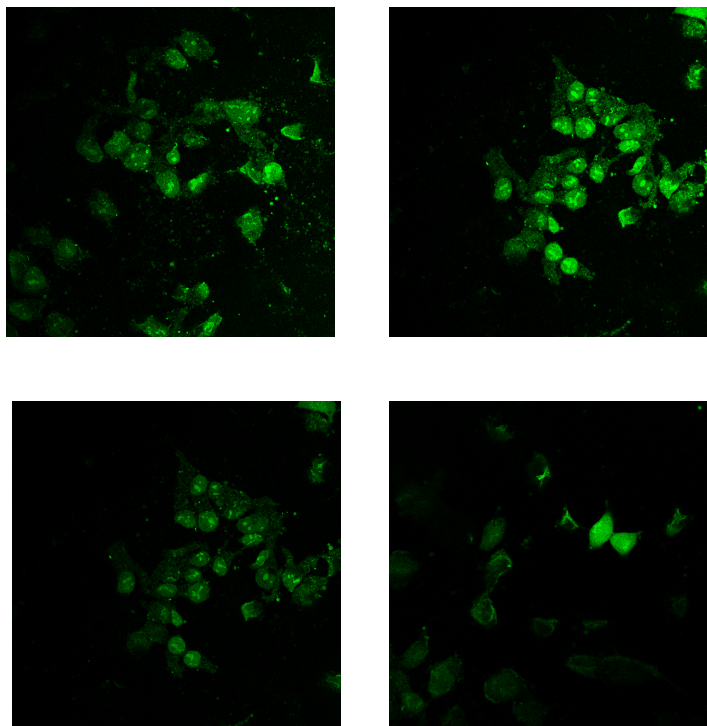


**Figura 7. Células transfectadas con MR-TC2.** Secuencia de imágenes tomadas cada 20 minutos tras la adición de aldosterona. Se observa marcaje pero al compararlo con el obtenido en las células no transfectadas nos damos cuenta de que es una marcaje inespecífico. No se observa la translocación al núcleo.

No se observa una translocación al núcleo tan claramente como con MR-YFP. Además aparece fluorescencia, que parece debida a uniones inespecíficas de FlaSh a proteínas celulares. Esto lo podemos observar al comparar estas imágenes con las obtenidas de células no transfectadas (Figura 8). De las células transfectadas en TC-1 no obtuvimos imágenes válidas debido a que había demasiado marcaje y no se observaban los núcleos celulares.

A continuación se muestra una serie de imágenes obtenidas con un microscopio confocal de células no transfectadas teñidas con el reactivo FIAsh (Figura 8).

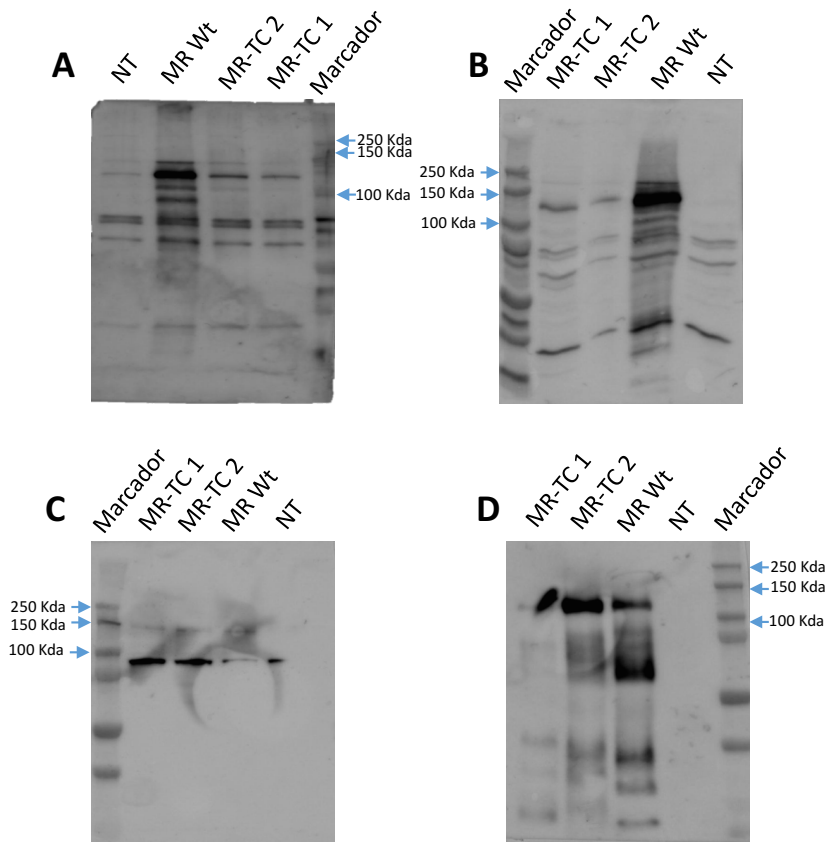




**Figura 8. Células no transfectadas.** Marcaje inespecífico en las células no transfectadas. En estas células no debería aparecer ningún tipo de señal fluorescente si el método funcionase adecuadamente.

Una posible explicación al hecho de no obtener fluorescencia específica sería el hecho de que las construcciones MR-TC por algún motivo no se estén expresando adecuadamente. Por esto decidimos medir la expresión de MR-TC1 y MR-TC2 mediante la técnica de western blot, comparando su expresión a la proteína MR nativa sobreexpresada utilizando el mismo vector (pcDNA3.1).

A continuación se muestran imágenes representativas de los experimentos de Western Blot con expresión de las construcciones (Figura X).



**Figura 9. Imágenes de los western blot con expresión de las construcciones.** En el western blot a) se usó como anticuerpo primario el anti MR H-300 y como anticuerpo secundario un anti conejo. Las muestras habían sido congeladas y apareció una banda inespecífica en el carril de las células NT a la altura de MR. Por eso repetimos el western blot usando los mismos anticuerpos pero con nuevas muestras y sin congelar obteniendo la imagen del western blot b), donde se aprecia una mayor expresión de MR nativo respecto a las construcciones TC. Para el western blot c) se usó como anticuerpo primario el anti MR 2B7 y como anticuerpo secundario un anti-ratón. Este anticuerpo, el MR 2B7, no es muy específico ya que aparece una banda inespecífica de mayor intensidad que la correspondiente a MR. Para el western blot d) se usó como anticuerpo primario en anti MR 1D5 y como secundario un anti-ratón. Con este western podemos ver como la expresión de la proteína nativa de MR se expresa en mayor cantidad que las construcciones TC.

## Discusión y conclusiones

El marcaje con FlaSh no ha resultado satisfactorio, principalmente debido al elevado marcaje inespecífico, que hace que no se pueda distinguir el marcaje de MR respecto al del resto de proteínas de la célula. Esto a su vez parece estar relacionado con el bajo nivel de expresión de las construcciones MR-TC. El bajo nivel de expresión podría deberse a que el motivo TC influye de alguna manera en la síntesis o maduración de la proteína, causando que la célula degrade más rápidamente la misma.

La falta de marcaje con FlaSh impidió el abordaje del objetivo 2 del trabajo. En el futuro se podrían buscar soluciones para solucionar esta falta de marcaje. En primer lugar, se podría tratar de optimizar el método cambiando las concentraciones de FlaSh, disminuyendo su concentración hasta 1  $\mu$ M o reduciendo el tiempo de incubación con FlaSh e incrementando los lavados con BAL. Esta estrategia busca minimizar el marcaje inespecífico, potenciando el específico de la proteína con el motivo TC. También podemos cambiar el motivo TC de lugar dentro de MR, ya que al no conocerse la estructura completa de MR puede que estuviese en una posición en la cual quedara en una conformación inadecuada para la unión con FlaSh. El defecto de esta aproximación es que sin conocer la estructura completa de MR no es sencillo poder predecir qué lugar de inserción produciría receptores funcionales a la vez que una conformación adecuada para la unión del reactivo.

Por último, existen métodos alternativos, diferentes a la estrategia FlaSh, para marcar proteínas fluorescentemente para experimentos de pulso y caza. Dos ejemplos de estas estrategias alternativas son la utilización de la metodología Halo-Tag o bien de la metodología SNAP-Tag. Estos métodos consisten en fusionar a la proteína de interés (en nuestro caso MR) una enzima que se une a un sustrato (un cloroalcano en el caso de Halo-Tag y una bencilguanina en el caso de Snap-Tag) que puede funcionalizarse usando por ejemplo sustancias fluorescentes, quedando de esta manera marcada la proteína de interés y permitiendo la realización de experimentos de pulso y caza.

## Anexos

### Anexo I Abreviaturas.

Abs: absorbancia.

ACTH: hormona adrenocorticotropa.

ASF: Factor estimulador de aldosterona.

BSA: albúmina de suero bovino.

DBD: dominio de unión a DNA.

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco.

ECA: enzima convertidora de angiotensina.

FlaSh: arseniato de fluoresceína.

FP: proteínas fluorescentes.

hMR: receptor de mineralocorticoides humano.

LB: Luria Bertani.

LBD: dominio de unión a ligando.

LPH: hormona lipolítica.

MR: receptor de mineralocorticoides.

MR-TC1: Receptor de mineralocorticoides que contienen en la posición 147 el motivo de tetracisteína HRWCCPGCCKTF.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 912338

Código de verificación: xhTRMEKd

Firmado por: JUAN CARLOS ESPINEL SOTO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2017/05/22 22:26:48

DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

2017/05/23 11:04:35

MR-TC2: Receptor de mineralocorticoides que contienen en la posición 147 el motivo de tetracisteína FLNCCPGCCMEP.  
 MR-WT: fenotipo salvaje del receptor de mineralocorticoides.  
 MR-YFP: Receptor de mineralocorticoides que contienen en la posición 147 la proteína fluorescente amarilla.  
 MSH: hormona estimulante de melanocitos.  
 NT: células no transfectadas.  
 NTD: dominio N-terminal.  
 NO: óxido nítrico.  
 Rpm: revoluciones por minuto.  
 SDS: dodecilsulfato de sodio  
 SNS: sistema nervioso simpático.  
 TC: tetracisteína.  
 WS: solución de trabajo.

## Bibliografía.

- Aguilar-Sánchez, C., Hernández-Díaz, I., Lorenzo-Díaz, F., Navarro, J. F., Hughes, T. E., Giraldez, T. y Diego Alvarez de la Rosa, D. (2012). Identification of Permissive Insertion Sites for Generating Functional Fluorescent Mineralocorticoid Receptors. *Endocrinology*. 153(7):3517-25.
- Benavente, D., Chue, C. y Ferro, C. (2010). Principales componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona: Historia, modulación farmacológica e impacto clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 21(4):516-29.
- Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG, Estess J, Warden MP, Gomez-Sanchez MT, Gomez-Sanchez EP. (2006). Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology*, 147(3):1343-8.
- Hernández-Díaz, I., Giraldez, T., Arnau, M., A. J. Smits, V., Jaisser, F., Farman, N. y Diego Alvarez de la Rosa, D. (2010). The Mineralocorticoid Receptor Is a Constitutive Nuclear Factor in Cardiomyocytes due to Hyperactive Nuclear Localization Signals. *Endocrinology*. 151(8):3888–99.
- Martin, B., Giepmans, B., Adams, S. y Tsien, R. (2005). Mammalian cell-based optimization of the biarsenical- binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nature Biotechnology*. 23(10):1308-14.
- Núñez, L., Caballero, R., Gómez, R., Vaquero, M., Delpón, E. y Tamargo, J. (2006). Mecanismo de acción de la eplerenona. *Revista Española de Cardiología*. 6:31B-47B.
- Silverthorn, D.U. (2009). Fisiología integrada II: equilibrio hidroelectrolítico (capítulo 20). En Silverthorn (4ª ed.) *Fisiología Humana. Un enfoque integrado* (pp 652-661). Buenos Aires: Panamericana.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 912338

Código de verificación: xhTRMEKd

Firmado por: JUAN CARLOS ESPINEL SOTO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2017/05/22 22:26:48

DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

2017/05/23 11:04:35

Viengchareun, S., Menuet, D., Martinerie, L., Munier, M., Tallec, M. y Lombès, M. (2007) The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho) physiological biology. *Nuclear Receptor Signaling*. 5:7-16.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 912338

Código de verificación: xhTRMEKd

Firmado por: JUAN CARLOS ESPINEL SOTO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha 2017/05/22 22:26:48

DIEGO ALVAREZ DE LA ROSA RODRIGUEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

2017/05/23 11:04:35