

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1 Proteína quinasas: AMPK y sus ortólogos.....	3
1.1 AMPK.....	3
1.1.1 Estructura cuaternaria y localización de AMPK.....	5
1.1.2 Regulación de AMPK.....	9
1.1.3 Secuencia de reconocimiento de las dianas de AMPK.....	13
1.1.4 Efectos fisiológicos de la activación de AMPK.....	14
1.2 Snf1	18
1.2.1 Estructura cuaternaria	18
1.2.2 Regulación.....	19
1.2.3 Efectos metabólicos.....	19
1.3 Trastornos derivados de defectos en la actividad AMPK.....	20
2 Ubicuitinación	22
2.1 La ubiquitina y la maquinaria de ubiquitinaación	22
2.2 Funciones de la ubiquitinaación	24
2.3 Familia Nedd4.....	27
2.3.1 Nedd4.1/Nedd4.2.....	28
2.3.2 Dianas de Nedd4.2: Transportadores de membrana.....	31
2.3.3 Regulación de Nedd4.2	33
2.4 Rsp5	35
2.4.1 Estructura.....	35
2.4.2 Función y dianas de Rsp5	36
2.5 Adaptadores en levadura y en mamíferos	38
2.6 Trastornos derivados de problemas en la actividad de Nedd4.2.....	42
MATERIAL Y MÉTODOS	51
1 Material biológico y condiciones de crecimiento.....	53

1.1	Bacterias.....	53
1.2	Levaduras.....	54
1.3	Cultivos celulares.....	56
2	Plásmidos.....	57
2.1	Vectores de expresión en levadura.....	57
2.2	Vectores de expresión en bacteria.....	58
2.3	Vectores de expresión en mamíferos.....	58
2.4	Vectores intermedios.....	58
3	Obtención de construcciones génicas.....	58
4	Obtención y análisis de proteínas.....	59
4.1	Obtención de extractos proteicos crudos.....	59
	a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
	b) Células <i>HEK293T</i>	60
4.2	Electroforesis de proteínas.....	60
4.3	Transferencia a membrana.....	60
4.4	Tinción de membranas con Ponceau S.....	61
4.5	Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....	61
5	Doble híbrido.....	62
5.1	Ensayo β -galactosidasa.....	63
	5.1.1 Ensayo cualitativo en filtro.....	63
	5.1.2 Ensayo cuantitativo en líquido.....	64
6	Mutagénesis dirigida.....	64
7	Determinación de la ubiquitinación <i>in vivo</i>	66
8	Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	67
9	Purificación por afinidad de GST.....	67
10	Co-inmunoprecipitación.....	68
	RESULTADOS	71
1	Obtención de hNedd4.2.....	73

2	Caracterización de la interacción física entre Nedd4.2 y AMPK.....	74
2.1	Ensayos de Doble híbrido	74
2.2	Ensayos de purificación por afinidad GST y co-inmunoprecipitación	77
2.3	Búsqueda de dianas de Nedd4.2: adaptadores entre AMPK y Nedd4.2.....	79
3	Caracterización de la modificación post-traducciona por Nedd4.2 y AMPK.....	81
3.1	Fosforilación de Nedd4.2 por AMPK.....	81
3.2	Determinación del sitio de fosforilación de Nedd4.2 por AMPK.....	83
3.3	Modulación de la interacción entre Nedd4.2 y ENaC por AMPK.	87
3.4	Efecto de la activación de Snf1 en la interacción por doble híbrido entre Nedd4.2 y ENaC.....	91
3.5	Papel de las serinas de Nedd4.2 fosforiladas por AMPK en la interacción por doble híbrido entre Nedd4.2 y ENaC.	95
3.6	Ubicuitinación de AMPK por Nedd4.2.....	98
	DISCUSIÓN	109
1	Caracterización de la interacción entre AMPK y Nedd4.2	112
1.1	Fosforilación de Nedd4.2 por AMPK.	114
1.2	Ubicuitinación de AMPK por Nedd4.2.....	118
	CONCLUSIONES	125
	ANEXO I	167