

Introducción

1. La membrana plasmática: Importancia biológica	19
1.1. Proteínas de transporte de la membrana plasmática.....	20
1.2. Transportadores de iones en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.2.1. Pma1, la bomba de protones esencial.....	22
1.2.2. Trk1 y Trk2, el sistema de transporte de potasio de alta afinidad.....	22
1.3. Transportadores de azúcares en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.3.1. La familia HXT, transportando glucosa al interior de la célula.....	24
2. Regulación de la expresión de transportadores de membrana a nivel transcripcional	27
2.1. Regulación transcripcional de PMA1.....	27
2.2. Regulación transcripcional de TRK1 y TRK2.....	28
2.3. Regulación transcripcional de transportadores de hexosas.....	29
3. Regulación postraduccional de transportadores de membrana	34
3.1. Fosforilación.....	34
3.2. Ubiquitinación.....	37
3.2.1. Funciones y topología de la ubiquitinación.....	38
3.3. Ubiquitinación de transportadores de membrana.....	40
3.4. Las E3 ubiquitina ligasas.....	41
3.5. Rsp5: estructura, función y dianas.....	42
3.5.1. Estructura.....	42
3.5.2. Función.....	44
4. Adaptadores del Tráfico Relacionados con Arrestinas: la familia ART	48
4.1. Características de la familia ART.....	50
4.2. Funciones de la familia ART.....	51

4.3. Regulación de la actividad de las proteínas ART.....	53
4.3.1. Características de la quinasa Snf1.....	54
4.3.2. Características de las proteínas 14-3-3.....	55
Objetivos.....	57
Materiales y métodos.....	59
1. Material biológico y condiciones de crecimiento.....	59
1.1. Condiciones de crecimiento de levadura.....	60
1.1.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos).....	60
1.1.2. Crecimiento en medio líquido.....	60
1.2. Condiciones de crecimiento de bacterias.....	60
2. Técnicas de transferencia génica.....	64
2.1. Transformación simple en levadura.....	64
2.2. Transformación de alta eficiencia.....	64
2.3. Transformación en bacteria.....	64
3. Técnicas de manipulación genética.....	65
3.1. Construcción de plásmidos.....	65
3.2. Disrupción Génica.....	68
3.3. Marcaje de genes con GFP.....	69
4. Análisis de proteínas.....	70
4.1. Obtención de extractos proteicos de célula completa (extractos crudos).....	70
4.2. Obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble.....	70
4.3. Electroforesis de proteínas.....	70
4.4. Transferencia a membrana (Western Blot).....	71
4.5. Tinción de membranas con Direct Blue.....	71

4.6. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....	71
5. Co-inmunoprecipitación.....	73
6. Ensayo de doble híbrido en levadura.....	74
7. Ensayo β-galactosidasa (ensayo cuantitativo en líquido).....	75
8. Análisis Northern blot.....	76
9. BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation).....	77
10. Cuantificación de la señal de GFP.....	78

Resultados

Capítulo1. Regulación postraduccional de transportadores de iones.....81

1. Estudio de la regulación por ubiquitinación del transportador de potasio Trk1.....	81
1.1. Ubiquitinación de Trk1.....	82
1.2. Rastreo de doble híbrido para la identificación de proteínas que interaccionen con Trk1.....	84
2. Estudio de los niveles de activación de Pma1 en respuesta a ayuno de potasio como confirmación a la predicción de un modelo matemático.....	86

Capítulo 2. Regulación de transportadores de glucosa a través de la familia de proteínas ART.....87

1. Caracterización bioquímica de la ruta de señalización Snf1 - Art4 - 14-3-3.....	87
1.1 Estudio de la interacción de la familia ART con la proteína quinasa Snf1.....	87
1.2. Mapeo de la interacción entre Art4 y Snf1.....	89
1.3. Estudio de la interacción de la familia ART con la proteína Bmh2 (14-3-3).....	90
1.4. Papel de Snf1 en la interacción entre Bmh2 y Art4.....	92
1.5. Mapeo de la interacción entre Art4 y Bmh2.....	94

2. Papel del complejo Snf1-Art4-14-3-3 en la regulación del transportador de glucosa de alta afinidad Hxt6	96
2.1 Interacción física entre Art4-Hxt6. Abordaje Split-Trp.....	96
2.2. Interacción Hxt6-Art4 y función de Snf1 y Bmh2. Coinmunoprecipitación.....	97
2.3. Interacción entre Hxt6-Art4 y función de Snf1 y Bmh2. BiFC.....	99
2.3.1. Cuantificación de la señal de interacción Hxt6-Art4.....	102
2.4. Análisis del papel de Snf1 y Bmh2 en la regulación de Hxt6 en respuesta a cambios en la fuente de carbono.....	105
2.5. Implicación de Art4 y Art7 en la endocitosis de Hxt6.....	106
2.6. Implicación de Art4 y Art7 en la acumulación de Hxt6.....	107
2.7. Análisis de los niveles de ARNm de Hxt6 en la cepa silvestre y art4.....	110
2.8. Acumulación de Art4 en respuesta a cambios en la fuente de carbono.....	112
2.9. Estudio de la toxicidad de la 2-deoxy-glucosa en mutantes art4 y art7.....	113
2.10. Estudio de la implicación de Art4 y Art7 en la regulación de otros transportadores de la familia HXT.....	114
2.11. Análisis de la acumulación de Hxt1, Hxt3 y Snf3 en mutantes art4 y art7.....	115
Discusión	117
Conclusiones	133
Anexos	135
Anexo 1. Mejora del sistema Split-Trp: una plataforma versátil para la detección de interacciones proteína-proteína	137
Anexo 2. Publicación: Potassium starvation in yeast: mechanisms of homeostasis revealed by mathematical modelling	147
Bibliografía	160