

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	VIII
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUCCION	1
1.1 DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS	2
<i>Figura 1. Vías de degradación de proteínas.</i>	5
1.2 AUTOFAGIA	6
1.3 LC3, PROTEÍNA CLAVE EN LA AUTOFAGIA	9
1.4 MECANISMOS DE CONTROL DE LA ACTIVIDAD AUTOFÁGICA	10
<i>Figura 2. Señalización que controla la autofagia.</i>	13
1.5 AUTOFAGIA SELECTIVA	14
<i>Figura 3. Diferencia entre las autofagias no selectiva y selectiva en relación a la formación del autofagosoma.</i>	17
1.6 CHAPERONAS Y COCHAPERONAS	18
1.7 COCHAPERONA BAG3	20
<i>Figura 4. Estructura de Bag3.</i>	24
1.8 PAPEL DE BAG3 EN LA AUTOFAGIA SELECTIVA	26
<i>Figura 5. Papel de Bag3 en la autofagia selectiva.</i>	30

2	HIPOTESIS	31
3	OBJETIVO GENERAL	31
4	OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
	OBJETIVO 1	31
	OBJETIVO 2.	31
	OBJETIVO 3.	31
5	MATERIALES Y METODOS	32
5.1	REACTIVOS.....	32
5.2	CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS LINEAS CELULARES.	34
5.3	INDUCCIÓN AUTOFAGIA Y USO DE INHIBIDORES.....	35
5.4	TRANSFECCIÓN DE siRNA.....	36
5.5	TRANSFECCIÓN DE PLASMIDIOS.	36
5.6	GENERACIÓN DE CÉLULAS ESTABLES KNOCKDOWN PARA BAG3.....	37
5.7	WESTERN BLOT.	38
5.8	IMMUNOFLUORESCENCIA.	40
5.9	EXTRACCIÓN DE RNA Y CUANTIFICACIÓN POR REAL-TIME qPCR.	41
5.10	PULSO CON [35S]-METIONINA/CISTEINA E INMUNOPRECIPITACIÓN DE LC3.....	42
5.11	CUANTIFICACIÓN DE LISOSOMAS.	43
5.12	CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROTEASOMA.....	44
5.13	DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD POR INCORPORACIÓN DE PI.....	44
5.14	DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS POR FRAGMENTACIÓN DEL DNA (SubG1).....	45

5.15	EXPRESIÓN DE RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	45
6	RESULTADOS.....	47
6.1	BAG3 REGULA LOS NIVELES LC3 SIN AFECTAR A OTRAS ÁTGS	47
	<i>Fig.6. Efecto de Bag3 en los niveles proteicos de LC3.....</i>	<i>56</i>
6.2	BAG3 NO AFECTA LA DEGRADACIÓN PROTEASOMAL O LISOSOMAL DE LC3	57
	<i>Fig. 7. Efecto de la modulación de Bag3 en la degradación lisosomal y proteasomal de LC3.</i>	<i>62</i>
6.3	BAG3 NO AFECTA LA TRANSCRIPCIÓN DE LC3	62
	<i>Fig. 8. Efecto de la modulación de Bag3 en la transcripción de LC3. .</i>	<i>64</i>
6.4	BAG3 CONTROLA LA TRADUCCIÓN DEL MRNA DE LC3	65
	<i>Fig. 9. Efecto de la modulación de Bag3 en la traducción de LC3.....</i>	<i>69</i>
6.5	LIPIDACIÓN DE LC3I NO DEPENDE DE LOS NIVELES BASALES DE LC3.....	69
	<i>Fig. 10. Efecto de la modulación de Bag3 en la lipidación de LC3 en células privadas de nutrientes (EBSS) o tratadas con inhibidor proteasomal MG132.</i>	<i>74</i>
7	DISCUSION	75
8	CONCLUSIONES	83
9	PROYECCIONES	83
10	REFERENCIAS	86
	FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	100

<i>Fig. S1. Efecto de la modulación de Bag3 en los niveles proteicos de LC3</i>	102
<i>Fig. S2. Efecto de la modulación de Bag3 en las fosforilaciones de mTOR y AMPK</i>	103
<i>Fig. S3. Controles de las determinaciones de las vías lisosomal y proteasomal</i>	105
<i>Fig. S4. Controles de los tratamientos para inhibir la traducción de proteínas</i>	107
<i>Fig. S5. Lipidación de LC3 inducida por privación de nutrientes e inhibición del proteasoma es inhibida por cicloheximida</i>	108
<i>Fig. S6. Controles sobre tamaño de células siBag3, localización de Bag3, muerte con los tratamientos que modulan a Bag3 y especificidad de anticuerpos</i>	110
FIGURAS ANEXAS	111