

2. OBJETIVOS

«A great flame follows a little spark»

Dante Alighieri (1265-1321)

2. OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis fue y ha sido en todo momento el alcanzar un mejor conocimiento del funcionamiento de la proteína HERC1. Para lograrlo, lo que hicimos a continuación fue desglosar nuestro objetivo general en subobjetivos que nos permitieran abordar el problema más eficazmente y desde múltiples frentes. Son estos subobjetivos, o estrategias para averiguar la función de HERC1, los que se detallan a continuación.

2.1. Identificación de moléculas asociadas a HERC1

Una manera de averiguar la función de una proteína se basa en conocer cuales son las moléculas a las que ésta se une dentro de las células. Por ello el primer objetivo de esta tesis consiste en utilizar técnicas tales como el sistema de los dos híbridos en levadura, la coimmunoprecipitación, la cromatografía de afinidad o los experimentos de pull-down para identificar moléculas que interaccionen con HERC1.

2.2. Análisis de la localización subcelular de HERC1

Otra forma de extraer información acerca de los quehaceres habituales de una proteína se basa en observar en qué lugares de la célula pasa aquélla su tiempo y qué señales celulares alteran dicha localización. El segundo objetivo de esta tesis se basa, por lo tanto, en el uso de técnicas de microscopía para determinar la localización subcelular de HERC1 y los factores que la regulan, así como para efectuar estudios de colocalización entre HERC1 y marcadores de distintas estructuras celulares.

2.3. Estudio de los efectos de la silenciación de HERC1

Una manera obvia de analizar la relevancia funcional de una proteína consiste en observar qué ocurre cuando dicha proteína es eliminada de la célula. En este sentido, la

técnica de interferencia por RNA (RNAi) permite reducir los niveles celulares de cualquier proteína y de su mRNA de forma bastante específica y eficaz. El tercer objetivo de la tesis es, por consiguiente, la aplicación de esta metodología al caso de HERC1 para estudiar a continuación cuales son los efectos de la reducción de los niveles de HERC1 sobre procesos celulares tales como la endocitosis o la secreción de proteínas a través del aparato de Golgi.

2.4. Estudio de los efectos de mutaciones en HERC1

Otra forma de estudiar la función de una proteína es generar formas mutadas de la misma y analizar las alteraciones ocasionadas por dichas mutaciones. Así, el cuarto y último objetivo de esta tesis consiste en crear mutaciones en HERC1 (ya sean deleciones o mutaciones puntuales) y analizar los efectos de éstas sobre la localización subcelular, interacciones y funciones conocidas de HERC1.