

RESUM

Les cèl·lules responen als estímuls ambientals a través d'una regulació precisa de l'expressió gènica. A aquest treball es va investigar la modulació dosi dependent de l'expressió de gens activats en resposta a estrès i per nutrients. Es va utilitzar una versió desestabilitzada de luciferasa de cuca de llum en cèl·lules vives de llevat com a reporter per a la detecció de l'expressió gènica a temps real. Aquest sistema altament sensible i no invasiu pot ser utilitzat simultàniament en diferents condicions experimentals a través de xicotetes alíquotes de cultiu. Això permet la caracterització dosi-resposta de la regulació dels promotors de llevat i pot ser utilitzat per a quantificar paràmetres importants com el llindar, la sensibilitat, el temps de resposta, l'activitat màxima i el rati de síntesi provocat per un determinat estímulo.

L'assaig luciferasa es va aplicar al promotor GAL1 regulat per nutrients i al promotor GRE2 activat en resposta a estrès. Es va observar que l'expressió de la luciferasa activada pel promotor GAL1 respon de forma dinàmica a les creixents concentracions de galactosa, amb un increment del rati de síntesi determinat per l'augment de llum en la fase lineal inicial de l'activació, en funció d'una gama de concentracions de galactosa ben definides. Aquest mecanisme de regulació depèn d'un augment en la remodelació de les histones i la conseqüent associació del complex ARN pol II. La remodelació de la cromatina dosi dependent sembla ser la base de l'expressió dinàmica de GAL1, ja que els mutants relacionats amb la dinàmica de les histones mostren perfils dosi-resposta severament afectats.

En el cas del promotor GRE2, es va demostrar que una versió d'una luciferasa desestabilitzada és una eina excel·lent per a descriure de forma quantitativa l'activació transcripcional transitòria. L'expressió de la luciferasa controlada pel promotor GRE2 respon de forma dinàmica a l'augment gradual d'estímul d'estrès osmòtic o oxidatiu. L'activació s'observa principalment a l'increment progressiu del temps al qual el promotor roman actiu. De forma diferent de GAL1, el promotor GRE2 opera a través d'un canvi apagat/encès en resposta a un augment d'estrès osmòtic a través de ratis de síntesi pràcticament constants i als quals la seua regulació només depèn de la remodelació de la cromatina i de la permanència de l'ARN pol II. Finalment, es pot especular que l'inductor Gal3 i la MAPK Hog1 són les molècules determinants per a

les diferents estratègies de resposta dinàmica per als dos promotors. A aquest treball s'identifiquen importants diferències a la senyalització dinàmica determinada per la dosi d'estímul a l'expressió gènica. En conjunt, l'assaig luciferasa presentat a aquest treball pot ser una eina interessant per a determinar i comparar de forma ràpida i precisa els paràmetres de l'expressió gènica.

Adicionalment, es va investigar la funció del factor de transcripció Smp1 involucrat en la resposta a osmoestrès en llevat. Una anàlisi de l'associació a la cromatina in vivo sota l'estrès osmòtic va demostrar que Smp1 s'uneix preferentment a regions transcrites (ORFs), el qual reflecteix un comportament diferent comparant amb altres activadors transcripcionals de la resposta a estrès osmòtic. Tot i així, Smp1 sembla ser important per a l'expressió gènica activada per estrès osmòtic només en la presència del gen natural induït i no de fusions artificials del promotor. Això evidencia el possible paper de Smp1 en la regulació de l'expressió gènica des de seqüències ORF i no a les regions promotores.