

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
1. El proceso de la activación transcripcional en células eucariotas.....	1
2. Maquinaria de la transcripción y estructura de la cromatina.....	2
2.1 SWI/SNF.....	6
2.2 SAGA.....	7
2.3 MEDIADOR.....	7
2.4 Variante de la histona H2A.Z.....	8
3. Los genes <i>GAL</i> : Sistema modelo para comprender la activación transcripcional en levadura.	9
3.1 Genes estructurales del sistema <i>GAL</i>	9
3.2 Regulación de los genes <i>GAL</i>	10
3.3 Función de modificadores de la cromatina en la inducción de los genes <i>GAL</i>	13
4. Respuesta a estrés osmótico en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
5. Genes reporteros.....	26
OBJETIVOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y condiciones de crecimiento.....	36
2. Transformación de levadura.....	38
3. La medición de la actividad de la luciferasa en tiempo real en células de levadura in vivo.....	39
4. Construcción de plásmidos.....	40
5. Manipulaciones de ADN.....	41
6. Purificación de ARN total de levadura con fenol ácido.	43
7. PCR cuantitativa en tiempo real con EVA Green™	47
8. Electroforesis de ácidos nucleicos.....	48
9. Northern blot.....	49
RESULTADOS	54

1. Construcción y optimización de un sistema luciferasa para la cuantificación de la expresión génica en células vivas de levadura.....	54
2. Determinación de la regulación dinámica del promotor <i>GAL1</i> en respuesta a la concentración del inductor galactosa usando el sistema luciferasa.....	56
3. Determinación de la dinámica de acumulación de ARN pol II y remodelación de la cromatina en el promotor <i>GAL1</i>	58
4. El efecto de mutaciones en los complejos SWI/SNF, SAGA y mediador y en la histona H2A.Z a la respuesta dinámica del promotor de <i>GAL1</i>	61
5. Efecto de mutaciones en SAGA, SWI/SNF, MEDIATOR a la remodelación dinámica de las histonas en el promotor <i>GAL1</i>	64
6. Determinación de la regulación dinámica del promotor <i>GRE2</i> en respuesta a estrés hiperosmótico usando el sistema luciferasa: Un ejemplo para la activación transitoria de un promotor por estrés ambiental.....	66
7. Reclutamiento de ARN pol II y remodelación de la cromatina en el promotor <i>GRE2</i>	71
8. El efecto de mutaciones en los complejos SWI/SNF, SAGA y mediador y en la histona H2A.Z a la respuesta dinámica del promotor de <i>GRE2</i>	73
9. Determinación de la regulación dinámica del promotor <i>GRE2</i> en respuesta a estrés oxidativo.	76
10. Determinación de la dosis-respuesta de otros promotores activados por estrés....	78
11. Estudio de los mecanismos que confieren los perfiles dosis-respuesta en los genes <i>GAL1</i> y <i>GRE2</i>	82
12. Estudios de la función de Smp1 en la respuesta a estrés salino.....	85
12.1. Determinación de la dinámica de la acumulación de Smp1 en los genes osmoinducibles <i>GRE2</i> , <i>HOR2</i> y <i>ALD6</i>	86
12.2 Función de Smp1 en la activación de la expresión génica en respuesta a estrés osmótico.....	92

12.3 Estudio de la función de Smp1 en la regulación de genes reporteros inducibles por NaCl.....	94
DISCUSIÓN.....	98
CONCLUSIONES.....	110
BIBLIOGRAFÍA.....	112
ANEXO.....	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organización del ADN en el núcleo.....	3
Figura 2. Papel de las enzimas pertenecientes al regulón <i>GAL</i> en el metabolismo de la galactosa en levadura.....	9
Figura 3. Los tres estados de regulación del promotor <i>GAL1</i> en función de la fuente de carbono en el medio de crecimiento.....	11
Figura 4. Regulación bajo estrés osmótico de la expresión génica a través de la ruta HOG.....	18
Figura 5. Esquema de los factores de transcripción específicos activados por Hog1 en condiciones de estrés abiótico.....	21
Figura 6. Modelo de represión/activación de Sko1-Cyc8-Tup1 regulado por la MAP quinasa Hog1 en respuesta a estrés.....	22
Figura 7. Perfiles de unión de Smp1 a lo largo de las regiones codificantes de genes osmoinducibles.....	25
Figura 8 . Estructura de la luciferasa de luciérnaga.....	30
Figura 9. Etapas de la oxidación de luciferina por la luciferasa de luciérnaga.....	31
Figura 10. Construcciones de plásmidos generados en el trabajo presentado.....	55
Figura 11. Perfiles de la actividad in vivo del promotor <i>GAL1</i> en presencia de diferentes concentraciones de galactosa.....	57
Figura 12. Tasas de síntesis máxima y tiempos de respuesta para el promotor del gen <i>GAL1</i> en respuesta a diferentes concentraciones de galactosa.....	58

Figura 13. Reclutamiento de ARN pol II en función de la concentración de galactosa en el promotor <i>GAL1</i>	60
Figura 14. Cuantificación de la asociación de la histona H3 en función de la concentración de galactosa en el promotor <i>GAL1</i>	61
Figura 15. Perfiles dosis-respuesta del promotor <i>GAL1</i> en células de levadura sometidas a diferentes concentraciones de galactosa en los mutantes (a) <i>gcn5</i> , (b) <i>snf2</i> (c) <i>htz1</i> y (d) <i>gal11</i> , utilizando la construcción p413 <i>GAL1</i> -lucCP ⁺	62
Figura 16. Los complejos SAGA, SWI/SNF, Mediator y la histona Htz1 son importantes para la respuesta dinámica del promotor <i>GAL1</i> a diferentes concentraciones de galactosa.....	64
Figura 17. Cuantificación de la asociación de la histona H3 en función de la concentración de galactosa en el promotor <i>GAL1</i>	65
Figura 18. Perfiles dosis-respuesta del promotor <i>GRE2</i> bajo diferentes concentraciones de (a) NaCl, (b) KCl y (c) sorbitol.....	67
Figura 19. Perfiles de la tasa máxima de síntesis (V _{max}) y de actividad máxima (A _{max}) de <i>GRE2</i> en condiciones de diferentes estreses.....	69
Figura 20. Cuantificación de la asociación de la ARN polimerasa II (A) y de la histona H3 (B) en función de la concentración de NaCl en el promotor <i>GRE2</i>	72
Figura 21: Perfiles dosis-respuesta del promotor <i>GRE2</i> sometido a diferentes concentraciones de NaCl en los mutantes (a) <i>snf2</i> , (b) <i>gcn5</i> (c) <i>htz1</i> y (d) <i>gal11</i> , utilizando la construcción p413 <i>GRE2</i> -lucCP ⁺	74
Figura 22. Función de los complejos SAGA, SWI/SNF, Mediator y la histona Htz1 en la respuesta dinámica del promotor <i>GRE2</i> a diferentes concentraciones de NaCl.....	76
Figura 23. Comportamiento dosis-respuesta del promotor de <i>GRE2</i> en condiciones de estrés oxidativo.....	77
Figura 24. Perfiles dosis-respuesta de los promotores (A) <i>HOR2</i> y (B) <i>ALD6</i> bajo diferentes concentraciones de NaCl.....	79
Figura 25. Comparación de la Actividad Máxima y de la Velocidad Máxima de diferentes promotores de genes osmoinducibles en presencia de NaCl.....	80
Figura 26. Perfiles dosis-respuesta de los promotores (A) <i>SOD2</i> y (B) <i>CTT1</i> bajo diferentes concentraciones de menadiona.....	81
Figura 27. Comparación de la Actividad Máxima y de la Velocidad Máxima de diferentes promotores de genes de respuesta a estrés oxidativo en presencia de Menadiona.....	82
Figura 28. La asociación de Gal4 y Gal3 con <i>GAL1</i> en el rango dinámico de concentraciones de galactosa.....	84

Figura 29. La asociación de Sko1 y Hog1 con el promotor <i>GRE2</i> condiciones de estrés salino.....	85
Figura 30. Determinación de la dinámica de la asociación de Smp1 en los genes osmoinducibles (A) <i>GRE2</i> , (B) <i>HOR2</i> y (C) <i>ALD6</i>	86
Figura 31. Determinación de la dinámica de asociación de Rpb3 en los genes osmoinducibles (A) <i>GRE2</i> , (B) <i>HOR2</i> y (C) <i>ALD6</i>	88
Figura 32. Determinación de la densidad del factor de transcripción Sko1 en distintas regiones de los genes osmoinducibles <i>GRE2</i> y <i>HOR2</i>	90
Figura 33. Determinación de la densidad del factor de transcripción Hot1 en distintas regiones de los genes osmoinducibles <i>GRE2</i> y <i>HOR2</i>	91
Figura 34. Análisis de transcripción de los genes osmoinducibles <i>ALD6</i> , <i>GRE2</i> y <i>HOR2</i> bajo estrés osmótico en presencia y ausencia del factor de transcripción Smp1.....	93
Figura 35. Comparación de los perfiles dosis-respuesta de los promotores <i>GRE2</i> y <i>ALD6</i> bajo diferentes concentraciones de NaCl en presencia y ausencia del factor Smp1.....	94
Figura 36. Modelo: Comparación de la regulación dosis-dependiente de la expresión génica de genes en respuesta a estrés con genes regulados por nutrientes.....	103

ÍNDICE DE LAS TABLAS

Tabla 1: Cepas de levadura utilizadas en este trabajo.....	36
Tabla 2: Plásmidos utilizados en este trabajo.....	41
Tabla 3: Sondas utilizadas para los diferentes análisis <i>Northern</i>	51