

RESUMEN

Las células responden a los estímulos ambientales a través de una regulación precisa de la expresión génica. En este trabajo se investigó la modulación dosis dependiente de la expresión de genes activados en respuesta a estrés y por nutrientes. Se utilizó una versión desestabilizada de luciferasa de luciérnaga en células vivas de levadura como reportero para la detección de la expresión génica en tiempo real. Este sistema altamente sensible y no invasivo puede ser utilizado simultáneamente en diferentes condiciones experimentales a través de pequeñas alícuotas de cultivo. Esto permite la caracterización dosis-respuesta de la regulación de los promotores de levadura y puede ser utilizado para cuantificar parámetros importantes como el umbral, la sensibilidad, el tiempo de respuesta, la actividad máxima y el ratio de síntesis provocado por un determinado estímulo.

Se aplicó el ensayo luciferasa al promotor *GAL1* regulado por nutrientes y al promotor *GRE2* activado en respuesta a estrés. Se observó que la expresión de la luciferasa activada por el promotor *GAL1* responde de forma dinámica a las crecientes concentraciones de galactosa, con un incremento del ratio de síntesis determinado por el aumento de luz en la fase lineal inicial de la activación, en función de una gama de concentraciones de galactosa bien definidas. Este mecanismo de regulación depende de un aumento en la remodelación de las histonas y la consecuente asociación del complejo ARN pol II. La remodelación de la cromatina dosis dependiente parece ser la base de la expresión dinámica de *GAL1*, pues los mutantes relacionados con la dinámica de las histonas muestran perfiles dosis respuesta severamente afectados.

En el caso del promotor *GRE2*, se demostró que una versión de una luciferasa desestabilizada es una herramienta excelente para describir de forma cuantitativa la activación transcripcional transitoria. La expresión de la luciferasa controlada por el promotor *GRE2* responde de forma dinámica al aumento gradual de estímulo de estrés osmótico u oxidativo. La activación se observa principalmente en el incremento progresivo del tiempo en que el promotor permanece activo. Diferentemente de *GAL1*, el promotor *GRE2* opera a través de un cambio apagado/encendido en respuesta a un aumento de estrés osmótico a través de ratios de síntesis prácticamente constantes y cuya regulación solamente depende de la remodelación de la cromatina y de la permanencia de la ARN pol II. Finalmente, se puede especular que el inductor Gal3 y la MAPK Hog1 son las moléculas determinantes para las diferentes estrategias de

respuesta dinámica para los dos promotores. En este trabajo se identifican importantes diferencias en la señalización dinámica determinada por la dosis de estímulo en la expresión génica. En conjunto, el ensayo de luciferasa presentado en este trabajo puede ser una herramienta interesante para determinar y comparar de forma rápida y precisa los parámetros de la expresión génica.

Adicionalmente se investigó la función del factor de transcripción Smp1 involucrado en la respuesta a osmoestrés en levadura. Un análisis de la asociación a la cromatina in vivo bajo estrés osmótico demostró que Smp1 se une preferentemente a regiones transcritas (ORFs) lo que refleja un comportamiento diferente comparando con otros activadores transcripcionales de la respuesta a estrés osmótico. Sin embargo, Smp1 parece ser importante para la expresión génica activada por estrés osmótico sólo en la presencia del gen natural inducido y no de fusiones artificiales del promotor. Esto evidencia el posible papel de Smp1 en la regulación de la expresión génica desde secuencias ORF y no en las regiones promotoras.