

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



Mecanismo de estimulación transcripcional del gen de osteocalcina por
vitamina D3: reclutamiento de complejos coactivadores
p160/p300/pCAF y/o DRIP en osteoblastos.

Tesis de Doctorado presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de
Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

Loreto del Carmen Carvallo Torres

2006

RESUMEN

La regulación de la transcripción por secuencias promotoras que interaccionan con receptores nucleares, involucra el reclutamiento de coactivadores que permiten: 1) modificar la estructura de la cromatina por medio de su actividad acetilasa de histonas (HAT). (Ej: complejo p160/p300/pCAF) y 2) la conexión con la maquinaria transcripcional basal. (Ej: complejo DRIP). Ambos tipos de coactivadores se unen en forma ligando dependiente a los receptores nucleares.

En esta tesis demostramos la participación y el mecanismo molecular que regula la unión de coactivadores al receptor de vitamina D3 (VDR), demostrando la interacción de los complejos p160 y DRIP dentro del contexto celular y evaluando los ciclos de unión de estos complejos coactivadores al promotor de osteocalcina de rata (OC), en respuesta a vitamina D3. Encontramos que la sobreexpresión de los coactivadores SRC-1 y Drip205 aumenta la actividad del promotor OC bajo estimulación con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3. Este efecto potenciador fue también confirmado mediante la utilización de dominantes negativos para SRC-1 y Drip205 respectivamente, los cuales inhibieron la actividad del promotor OC frente a la estimulación por el ligando. Además, por co-inmunoprecipitación de proteínas, demostramos que VDR, SRC-1, p300 y Runx2 son componentes de un mismo complejo nuclear. También estudiamos la unión de estos complejos coactivadores, en condiciones basales y de estimulación por vitamina D3, al promotor de OC de rata, mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina acoplado a PCR en tiempo real. Observamos que el coactivador SRC-1 se asocia al promotor de OC durante las primeras cuatro horas de estimulación con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3, a diferencia de Drip205 que interactúa con el promotor OC sólo después de ocho horas de incubación con el

ligando. Podemos concluir entonces que, ambos coactivadores interactúan con el receptor de vitamina D3, en forma secuencial, excluyente y no cíclica. Conjuntamente, investigamos la expresión del gen OC bajo el tratamiento con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 y encontramos que existe una estabilización del mRNA de osteocalcina dado por el tratamiento con vitamina D3. Observamos además, un aumento de la acetilación de la histona H4 tras la estimulación con vitamina D3, lo que se correlaciona con la unión del coactivador SRC-1 al promotor de OC. Por otro lado, la sobreexpresión de una mutante de SRC-1, que presenta una delección entre los aminoácidos 1107 y 1441 ($\Delta 1107-1441$) y que no presenta actividad HAT, no aumentó la actividad transcripcional del promotor OC. En su conjunto nuestros resultados indican, que dos clases de coactivadores SRC-1 y Drip205, estarían participando en el aumento de la actividad transcripcional del gen de OC mediado por $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3, y que ambos coactivadores interaccionan con el receptor de vitamina D3, pero en forma secuencial, excluyente y no cíclica.

