

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



**Modulación de la transactivación del gen de  
osteocalcina estimulada por  $1\alpha$ , 25-dihidroxitamina  
 $D_3$  mediante la fosforilación del receptor nuclear de  $1\alpha$ ,  
25-dihidroxitamina  $D_3$ .**

Tesis doctoral 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

Por

**Roberto Emilio Paredes Thompson**

Tutor: Dr. Martín Montecino Leonard

2004

## RESUMEN

El gen de osteocalcina (OC) de rata codifica la proteína no colágena más abundante de la matriz extracelular del tejido óseo, siendo considerada un marcador terminal de diferenciación ósea. La transcripción tejido-específica de este gen está regulada principalmente por el factor de transcripción óseo-específico Runx2 y es aumentada en respuesta a la hormona  $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina  $D_3$  a través de su receptor específico (VDR). El promotor del gen OC contiene tres sitios de unión para Runx2 denominados sitios A, B y C. Mutaciones en los sitios A y B, los cuales flanquean un elemento de respuesta a  $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina  $D_3$  (VDRE), disminuyen la estimulación de la transcripción de OC mediada por  $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , lo que sugiere una fuerte interacción funcional entre VDR y Runx2. Se ha descrito que en la transactivación mediada por  $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina  $D_3$  participan complejos multiproteicos que se asocian al receptor como DRIP o SRC-1 y la activación de las vías de señalización que involucran a CK2 y PKC, mediante la fosforilación de VDR en los residuos de serina 208 y 51, respectivamente. En esta tesis se postula que la fosforilación de VDR afecta la transactivación del gen de OC de rata mediada por  $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina  $D_3$ . Los objetivos generales planteados en esta tesis fueron los siguientes: i) determinar la formación de complejos multiproteicos que contienen VDR en un contexto nuclear osteoblástico, ii) evaluar el efecto de la fosforilación de VDR sobre su interacción con coactivadores nucleares en células osteoblásticas y iii) estudiar el efecto de la fosforilación de VDR sobre la transactivación del gen de osteocalcina de rata en células osteoblásticas. Utilizando una combinación de aproximaciones

experimentales como interacción ADN-proteína y proteína-proteína, adenovirus recombinante, cultivo de osteoblastos diploides normales, microscopía de fluorescencia, fosforilación *in vitro* y análisis de genes reporteros, se logró determinar que VDR interacciona en forma directa con el factor de transcripción Runx2, lo cual es fundamental para la transactivación de OC mediada por  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ . Por otra parte, la fosforilación de VDR en la serina 51 por PKC promueve la localización nuclear del receptor y la fosforilación de VDR por CK2 en la serina 208 aumenta la capacidad de unión del receptor con coactivadores nucleares tales como DRIP205 y SRC-1. Además, la mutación sitio dirigida de este residuo disminuye la transactivación de OC mediada por  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , indicando un papel central de la fosforilación de VDR por CK2 en la regulación transcripcional del gen OC. Los resultados de esta tesis indican que la interacción directa entre Runx2 y VDR permite hacer converger las vías de señalización tejido-óseo específicas y de regulación por  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , favoreciendo la posterior formación de un complejo estable sobre el promotor OC. Además, la fosforilación de VDR modula la transactivación del gen de OC mediada por la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  a través de la regulación de la localización nuclear del receptor y de su interacción con coactivadores transcripcionales.