

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**



“Participación de complejos remodeladores de cromatina SWI/SNF en la activación transcripcional del gen de osteocalcina: Mecanismo de reclutamiento de estos complejos a la región promotora”

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

ALEJANDRO VERLAINE VILLAGRA MACAYA

RESUMEN

Osteocalcina (OC) es una proteína óseo-específica que se expresa en etapas tardías de diferenciación, durante la mineralización de la matriz extracelular. La expresión de este gen es considerada como uno de los principales marcadores de diferenciación osteoblástica y su regulación transcripcional involucra múltiples pasos, como la presencia de reguladores transcripcionales específicos y una reorganización de la arquitectura cromatínica en su región promotora. En células que no expresan el gen OC, la región promotora se encuentra inaccesible a la maquinaria transcripcional, formando parte de una estructura cromatínica altamente compactada. Por otro lado, en células que expresan activamente el gen OC, la región promotora es más accesible, lo cual se refleja por la presencia de dos regiones hipersensibles a la digestión con DNasa I (DHS). Estos DHS abarcan todos los elementos regulatorios claves que controlan la actividad transcripcional basal tejido-específica y la estimulada por vitamina D3. La región entre estos dos sitios hipersensibles a la digestión con DNasa I se encuentra organizada como un nucleosoma altamente posicionado, el cual soporta una estructura tridimensional donde los factores regulatorios de la transcripción se unen tanto a la región promotora proximal como distal, creando interacciones entre ambas regiones. Los mecanismos involucrados en la generación de esta estructura remodelada no han sido definidos, por lo que su estudio resulta de gran importancia para la comprender en forma global el mecanismo que gobierna la regulación transcripcional de este gen.

Entre los complejos celulares que poseen actividad remodeladora de cromatina se encuentran los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP. En mamíferos se han encontrado diferentes complejos con esta actividad, uno de ellos corresponde a los complejos SWI/SNF. Estos complejos multiproteicos contienen una subunidad catalítica que posee actividad ATPásica, la cual puede ser BRG-1 o BRM. Mutaciones en el dominio ATPásico de BRG-1 o BRM elimina su capacidad de unir ATP, resultando en la formación de complejos SWI/SNF inactivos. Para comprender los mecanismos involucrados en el remodelamiento cromatínico asociado a la actividad transcripcional del gen OC, hemos transfectado en forma estable células osteoblásticas con construcciones codificantes para versiones mutadas de BRG-1 y BRM marcadas con un epítipo FLAG y bajo el control de un promotor inducible. Encontramos que la sobre-expresión de estas proteínas mutantes en su actividad ATPásica resultan en la formación de complejos SWI/SNF inactivos que se unen al promotor OC. Esta interacción se correlaciona con una significativa inhibición de la transcripción de OC endógena, tanto a nivel basal como de estimulación por vitamina D3, además de una disminución en la hipersensibilidad a nucleasas de su región promotora. La inhibición transcripcional de OC fue hallada en osteoblastos diferenciados, como lo es la línea celular ROS 17/2.8. Mas aún, encontramos la misma acción de BRG1 y BRM mutantes en células C2C12 comprometidas al fenotipo osteoblástico. Tomando nuestros resultados en conjunto, se puede concluir que complejos SWI/SNF tienen una importante función en la remodelación y concomitante activación transcripcional del gen OC en osteoblastos.