



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA Y BIOINFORMÁTICA

Evaluación *in vitro* de las interacciones entre el receptor de vitamina D₃ y los coactivadores SRC-1 y DRIP205: Rol de la fosforilación



Profesor Guía: Martín Montecino Leonard
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Tesis para ser presentada a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción

CINTHYA GRACE RUIZ-TAGLE SEGUEL
CONCEPCIÓN-CHILE
2010

Resumen

La vitamina D₃ es el precursor de la hormona 1 α ,25(OH)₂D₃ que es metabolizada en el hígado y luego en el riñón. 1 α ,25(OH)₂D₃ ejerce efectos fisiológicos a través del receptor de vitamina D₃ (VDR) regulando principalmente la homeostasis del calcio en el intestino, riñón y hueso, aunque también ejerce efectos en otros tipos celulares.

VDR es miembro de la superfamilia de receptores nucleares y posee la capacidad de iniciar procesos transcripcionales llamados efectos genómicos y procesos no-genómicos que implican la activación de vías de transducción de señales, así como también apertura de canales iónicos. Un modelo de estudio de los efectos genómicos es la regulación del gen de osteocalcina, que codifica para una proteína hueso-específica involucrada en la mineralización de la matriz extracelular de los osteoblastos en etapas tardías de la diferenciación celular. La transcripción basal del gen es regulada por el factor transcripcional Runx2 y puede ser estimulada por 1 α ,25(OH)₂D₃. La hormona produce el reclutamiento de proteínas coactivadoras dentro de las que destacan la familia p160/SRC y el complejo Mediador, específicamente la subunidad DRIP205, quienes interactúan con VDR de manera secuencial. Por otro lado, los efectos no-genómicos de 1 α ,25(OH)₂D₃ son rápidos (dentro de segundos a minutos) y estimulan eventos normalmente asociados a la activación de receptores de membrana como la activación de proteínas quinasas como PKC y MAPK.

Se ha demostrado que tanto SRC-1 y DRIP205 son blancos de proteínas quinasas; específicamente, SRC-1 puede ser fosforilado en siete residuos, al igual que DRIP205. Dentro de ellos se ha observado que la fosforilación de SRC-1 en los residuos T1179 y S1185 por MAPK es relevante para su actividad como coactivador y que la fosforilación de DRIP205 en T1032 y T1457 también por MAPK aumenta la estabilidad y vida media del coactivador.

En base a que ambos coactivadores son blanco de MAPK y que la modificación regula su actividad como coactivador postulamos que las modificaciones covalentes regulan la interacción VDR-SRC-1 y VDR-DRIP205.

En esta investigación se procedió a generar las proteínas recombinantes GST-VDR, 6xHis-SRC-1 y 6xHis-DRIP205 a través del sistema de expresión mediante baculovirus, de las cuales, sólo las dos primeras fueron obtenidas. Posteriormente, se realizaron ensayos funcionales para determinar su capacidad de interactuar con otras proteínas a través de ensayos de *GST-pulldown*. Para finalizar, se fosforiló la proteína 6xHis-SRC-1 y se realizó un ensayo de interacción proteína-proteína para evaluar el rol de la fosforilación del coactivador en su interacción con GST-VDR. Por ensayos de *GST-pulldown* se demostró que la fosforilación de SRC-1 por MAPK aumenta su habilidad de interactuar con el receptor VDR.

