

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



“REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE OSTEOCALCINA EN CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS: ROL DE LA ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DEL PROMOTOR Y DE COFACTORES REGULATORIOS GENERALES”

TESIS DOCTORAL PRESENTADA A LA ESCUELA DE GRADUADOS
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

POR

JOSÉ HERNÁN SIERRA CANALES

Tutor : Dr. Martín A. Montecino L.

RESUMEN

En esta Tesis hemos demostrado la participación de dos elementos reguladores que se encuentran operando en niveles diferentes para el control de la regulación transcripcional del promotor del gen osteocalcina (OC). En primer lugar estudiamos la participación de p300 en la regulación del promotor OC en células ROS 17/2.8 de rata. p300 es un coactivador transcripcional con múltiples características, que funciona como un adaptador de factores de transcripción y posee actividad acetiltransferasa intrínseca (HAT) la que es crítica para la transcripción dependiente de esteroides. Se investigó el control que ejerce p300 sobre la actividad basal y estimulada por vitamina D₃ en el promotor OC. Descubrimos que la sobreexpresión transiente de p300 incrementa en forma dosis-dependiente la actividad basal y estimulada por vitamina D₃. Este efecto requiere la integridad de los sitios de unión para Runx2/Cbfa1 y del elemento de respuesta a vitamina D₃. Además, por ensayos de coimmunoprecipitación de proteínas y de inmunoprecipitación de cromatina demostramos que Runx2/Cbfa1 y p300 son componentes del mismo complejo e interactúan en el promotor OC en células osteoblásticas. Este efecto de p300 es independiente de su actividad HAT intrínseca y coopera con P/CAF de la misma manera que la proteína silvestre. A partir de nuestros resultados proponemos que p300 interactúa con reguladores transcripcionales claves del gen OC y

sirve como un puente entre las secuencias distales y proximales con el fin de facilitar la respuesta a vitamina D₃.

También se estudió la secuencia de ADN ubicada entre los dos sitios hipersensibles del promotor OC. Se ha postulado que esta secuencia posicionaría un nucleosoma que estaría permitiendo la interacción de los elementos reguladores situados en la región distal del promotor con los elementos situados en su región proximal. Usando diferentes construcciones del promotor y estrategias de transfección celular se determinó que la eliminación de esta secuencia, y como consecuencia de la aproximación de los sitios hipersensibles, incrementa los niveles de transcripción basal. Por el contrario la introducción de una secuencia excluyente de nucleosomas disminuye significativamente los niveles transcripcionales del promotor. En su conjunto, nuestros datos indican que la secuencia localizada entre ambos sitios hipersensibles esta promoviendo el posicionamiento de un nucleosoma y podría estar permitiendo la interacción entre los elementos proximales y distales