

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

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



“ ROL DE FACTORES INDUCTORES DE TRANSCRIPCIÓN BASAL EN LA REORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DE LA REGIÓN PROMOTORA PROXIMAL EN EL GEN DE OSTEOCALCINA ”

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

JOSÉ LEONARDO GUTIÉRREZ CONTRERAS

PROFESOR TUTOR: Dr. MARTÍN MONTECINO LEONARD

Resumen

El ADN dentro del núcleo eucariótico se encuentra a la forma de un complejo nucleoproteico denominado cromatina, siendo los nucleosomas la unidad fundamental de esta estructura. La cromatina funciona como moduladora del acceso al ADN de gran variedad de proteínas y complejos proteicos involucrados en distintos eventos nucleares, como lo es la transcripción. Eventos como éste requieren que la región promotora de un determinado gen adopte una organización nucleosomal definida, de tal forma que permita el acceso de distintos factores reguladores y de la maquinaria transcripcional basal. En los últimos años se ha descrito una gran variedad de complejos multiproteicos capaces de modificar la estructura cromatínica. Estos complejos han sido denominados como remodeladores o modificadores de cromatina. Gran variedad de estudios han determinado la participación de estos complejos en la remodelación nucleosomal de las regiones promotoras de distintos genes, posibilitando así su activación transcripcional. Los complejos remodeladores de cromatina se unen al ADN y nucleosomas de una manera secuencia-inespecífica. A este respecto, se ha observado que diversos factores de transcripción pueden interaccionar con los complejos remodeladores, lo que abre una vía para el reclutamiento de éstos hacia las regiones promotoras de genes.

El gen de osteocalcina (OC) de rata codifica una proteína de 10 KDa, específica de tejido óseo. Se ha descrito que la expresión basal y tejido específica de este gen está regulada por elementos moduladores ubicados en su región promotora proximal, entre los que se encuentra una secuencia de unión para el factor de transcripción Runx/Cbfa. Diversos estudios han puesto de relieve el papel central que Runx/Cbfa juega en la expresión del gen de OC. La activación transcripcional de este gen concuerda con la aparición de un sitio hipersensible a DNasa I en su región promotora proximal (-170 a -70), lo que estaría reflejando un cambio en la organización nucleosomal asociado a su activación. Este hecho da lugar a la posibilidad de que complejos remodeladores de cromatina estén

participando en la remodelación nucleosomal del promotor de este gen, durante su proceso de activación transcripcional. Tal evento de remodelación podría ser promovido además por factores inductores de la transcripción basal del gen de OC, como lo es Runx/Cbfa. Estos dos últimos aspectos no han sido evaluados con anterioridad al desarrollo de esta tesis.

Obedeciendo a estos planteamientos, en esta tesis se propuso como objetivo general investigar el papel que poseen factores inductores de la transcripción basal de OC sobre la reorganización nucleosomal que sufre la región promotora proximal de este gen en su proceso de activación transcripcional. Conjuntamente con el desarrollo de este objetivo, se propuso establecer la presencia de complejos remodeladores ATP-dependientes en células óseas y analizar aspectos relacionados con la movilización de los nucleosomas sobre la cadena de ADN, en el contexto de la región promotora proximal del gen de OC. La reconstitución *in vitro* de distintos segmentos de ADN (correspondientes a la región promotora del gen de OC) como mononucleosomas, fue utilizada como metodología principal en este trabajo de tesis.

El trabajo desarrollado en esta tesis permitió definir las características de la interacción de Runx/Cbfa con su secuencia de unión específica en el contexto nucleosomal. Además estableció la presencia de una región posicionadora de nucleosomas entre las regiones distal y proximal del promotor del gen de OC, la cual se encuentra efectivamente *in vivo* ocupada por un nucleosoma en el promotor activo. Este trabajo también estableció la presencia en células óseas de complejos con actividad remodeladora de nucleosomas ATP-dependiente. Los estudios de remodelación nucleosomal, en conjunto con el análisis de los patrones de reconstitución nucleosomal de distintos segmentos del promotor del gen de OC, permitieron definir la presencia de una región excluyente de nucleosomas, ubicada en la región promotora proximal de este gen. Se determinó que esta región excluyente influye en la posición traslacional adoptada por los nucleosomas en los segmentos del promotor que incluyen esta región, tras su reconstitución *in vitro*, y que también influye en sus patrones de remodelación nucleosomal. De

gran importancia es que este último aspecto puso de relieve que la secuencia de ADN puede estar influyendo sobre la actividad remodeladora de nucleosomas.

Los resultados obtenidos en esta tesis, en su conjunto, han permitido plantear un mecanismo que describe la secuencia de eventos que pueden estar formando parte de la reorganización nucleosomal acontecida en la región promotora proximal del gen de OC, durante su proceso de activación transcripcional.

