

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA ⁴²
DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EL PAPEL DE LA BIOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN
GENÉTICA DE LAS ENZIMAS PARTICIPANTES EN
LOS PROCESOS DE CARBOXILACIÓN EN
MAMÍFEROS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

BIOL. ROCIO RODRIGUEZ MELENDEZ

MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

* A mi esposo *Valentín Ekiaka Nzai* quien siempre me impulsado no solamente a ser mejor y a tener objetivos realistas, sino también a luchar por la invariabilidad del amor conyugal, pilares de una vida plena. Gracias Val.

*A mi pequeña hija *Denhi Rosette*, la flor que llenó de felicidad a toda nuestra familia. Te amo mi chiquita y gracias por la alegría que has traído a nuestras vidas.

Rocío

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE GENÉTICA DE LA NUTRICIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA TUTORÍA DEL DR. ANTONIO VELÁZQUEZ ARELLANO

ESTE TRABAJO FUE SUBVENCIONADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT); PROYECTOS 2797-M Y 4054-M

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Enrique Piña Garza
Secretario:	Dr. Antonio Velázquez Arellano
Vocal:	Dr. Alfonso León del Río
Vocal:	Dra. Alicia González Manjarrez
Vocal:	Dr. Félix Recillas Targa
Suplente:	Dr. Armando Tovar Palacios
Suplente:	Dr. Ignacio Camacho Arroyo

AGRADECIMIENTOS

Existen varias personas quienes de alguna manera contribuyeron a la realización de este proyecto.

En particular quiero agradecer a:

- Los Doctores Alfonso León, Ignacio Camacho, Diego González y Gerardo Gamba por su valiosa colaboración y asesoría.
- Los Técnicos académicos Martha Pérez, Saúl Cano e Isabel Ibarra por su apoyo en la estandarización de las técnicas utilizadas.
- Los alumnos Sara Méndez, Alejandra Díaz, Isabel Cicerón, Daniel Ortega, Merlín Toledo, Gabriela Sandoval, Víctor Serrano por su aportación.
- Ángeles López, María Luisa Arroyo y Matías Aguilar, por el servicio recibido durante mi estancia en la Unidad de Genética.

A todos y a cada uno (a): muchas gracias.

Aprovecho esta oportunidad para expresar mi reconocimiento a los Doctores: Gerardo Jiménez, Silvestre Frenk y Marcela Vela por sus firmes consejos y palabras alentadoras; serán para mí un ejemplo a seguir.

Tengo una deuda de agradecimiento con el Dr. Antonio Velázquez Arellano por haberme iniciado en el camino de la investigación científica. Gracias Doctor por confiar en mí. A pesar de mis limitaciones, me tuviste paciencia orientándome hasta hacer realidad una de mis aspiraciones fundamentales. De todo corazón te expreso mi profunda gratitud.

Por último, y no por ello menos importante, debo darle las Gracias al Dios de la Vida por haberme regalado una familia y amigos únicos que siempre me alentaron incondicionalmente. A mis papas -Esperanza y José-, Pepe, Oscar, Adriana, Edgar, Pbro. Beto, Rosalía, Alberto, Fede, Nelly, Mauri, Jeff, Sonia, Henriette, Pbro. Etienne, Mónica y Alma; Aprecio muchísimo su cariño y amistad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	11
Biotina	11
Enzimas dependientes de biotina	12
Ciclo de la biotina	14
Biotinilación en bacterias	16
Holocarboxilasa Sintetasa (HCS) humana	17
Deficiencia de biotina	17
Biotina y expresión génica	18
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
HIPÓTESIS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Diseño experimental	23
Animales y dieta deficiente de biotina	23
Preparación de soluciones	24
Aislamiento de hepatocitos	24
Cultivos primarios de hepatocitos	25
Preparación de órganos	25
Determinación de la actividad específica de la Piruvato Carboxilasa (PC) y la Propionil CoA Carboxilasa (PCC)	26
Análisis de proteínas biotiniladas por "blots" de estreptavidina	27
Determinación de la masa de PC y PCC	28
Análisis de los RNA mensajeros de PC y PCC	28

-Extracción de RNA total	28
-Análisis por RT-PCR de los RNAm de la PC y la PCC	29
-Análisis de los productos de PCR por Southern blot	31
-Marcaje de la sonda	31
-Análisis densitométrico	32
Análisis de los RNAm de la HCS	32
-Clonación de un fragmento de cDNA de la HCS de la rata	32
-Análisis por RT-PCR de los RNAm de la HCS	33
-Efecto "curso temporal" de la biotina sobre los RNAm de la HCS	33
RESULTADOS	34
Determinación del estado nutricional de biotina	34
Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos	34
Determinación de la actividad enzimática de la PC y la PCC, y enzimas biotiniladas en cultivos de hepatocitos deficientes al añadir biotina	37
Efecto de la deficiencia de biotina sobre las carboxilasas mitocondriales	40
Análisis de los RNAm de la HCS en la deficiencia de biotina	40
-Clonación de un fragmento de cDNA de la HCS de la rata	40
-Análisis de los RNAm de la HCS	40
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57
APÉNDICE A: Preparación de soluciones	63
APÉNDICE B: Alineación de las secuencias de las HCS humana y de <i>Sacharomyces</i>	61
APÉNDICE C: Datos complementarios a las figuras 5 y 6	69
APÉNDICE D: Artículos publicados	70
APÉNDICE E: Premios recibidos por esta investigación	71

RESUMEN

La biotina es una vitamina que actúa como cofactor de enzimas, llamadas carboxilasas, que fijan CO_2 a distintos metabolitos en diversas reacciones metabólicas. En los mamíferos existen cinco carboxilasas dependientes de biotina: dos formas de acetil CoA carboxilasa (ACC-1 y ACC-2) expresadas en el citoplasma, y tres carboxilasas mitocondriales, que son la piruvato carboxilasa (PC), la propionil CoA carboxilasa (PCC) y la metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC). Estas enzimas catalizan reacciones clave en los procesos de gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos. La reacción de biotinilación de las carboxilasas es catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS).

Recientemente se descubrió una función adicional de la biotina en células eucariontes, la de regular la expresión genética de algunas proteínas específicas como la glucocinasa y la guanilato ciclasa, entre otras. Sin embargo, el conocimiento acerca de esta nueva función de la biotina en relación con las enzimas que intervienen en su propio metabolismo es muy escaso. Esta situación nos motivó a estudiar a la biotina como regulador de las carboxilasas (PC y PCC) y la holocarboxilasa sintetasa (HCS), enzimas clave en el metabolismo de la biotina, en diferentes órganos de la rata.

Con este propósito, realizamos los estudios en ratas macho de la cepa Wistar a las que les provocamos deficiencia de biotina alimentándolas con una dieta deficiente de biotina y con avidina. En estas ratas comprobamos el estado funcional de la biotina midiendo la actividad específica de la PCC en el hígado durante la deficiencia. Además, en hepatocitos en cultivo, determinamos las actividades específicas y el grado de biotinilación de las enzimas PC y PCC en condiciones basales y en varios tiempos después de adicionar biotina.

En las ratas con carencia de biotina obtuvimos diferentes órganos (hígado, riñón, músculo y cerebro) en los cuales determinamos la cantidad total (masa proteica) de la PC y PCC y sus respectivos RNAs mensajeros. Por otro lado, evaluamos el efecto de la biotina sobre las cantidades de RNA mensajero de la HCS en estos órganos.

Cuando determinamos los cambios en la actividad enzimática de la PCC y de la PC, y su grado de biotinilación por *blots* de estreptavidina, encontramos que la PC se reactiva y se rebiotinila rápidamente, en la primera hora después de agregar biotina. Por el contrario, la PCC que se encontraba con una actividad muy deficiente, a los 5 minutos se incrementó en una tercera parte de lo normal, pero tardó 24 horas en alcanzar el nivel máximo, lo que nos sugería que había menos apocarboxilasas, y por ello se necesitó más tiempo para sintetizarse.

En los diferentes órganos estudiados, la regulación de las carboxilasas (PC, PCC) parece estar mediada de modo postranscripcional, ya que no observamos cambios asociados a la deficiencia de biotina en los niveles de RNAm de estas enzimas. La regulación de la HCS puede ser a nivel de la transcripción o procesamiento y/o estabilidad del RNAm. Los cambios de RNAm de la HCS que encontramos parecen ser la primera instancia conocida en mamíferos, de un efecto de una vitamina hidrosoluble sobre los RNAm de una enzima que actúa directamente sobre tal vitamina.

Este trabajo aporta evidencias de que la biotina, además de su papel como cofactor de las carboxilasas, actúa como un modulador de la expresión genética de las enzimas con las cuales está relacionada funcionalmente. Finalmente este trabajo puede utilizarse como modelo para probar un papel similar para otras vitaminas hidrosolubles.

ABSTRACT

Biotin is the cofactor of the carboxylases of pyruvate (PC), propionyl CoA (PCC), 3-methylcrotonyl CoA (MCC) and acetyl CoA, the first three located in the mitochondria and the last in the cytosol. These enzymes participate in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, catalyzing the carboxylation of different metabolites. They are synthesized as inactive apocarboxylases. Holocarboxylase synthetase (HCS) catalyzes their activation by covalently binding biotin to a lysine residue.

We have studied whether biotin also regulates their expression, as it does other, nonrelated enzymes (e.g., glucokinase, phosphoenol pyruvate carboxykinase, guanylate cyclase). For this purpose, HCS, PC and PCC mRNAs were studied in biotin-deficient rat liver, kidney, muscle and brain of biotin-deficient rats. PC and PCC specific activities and protein masses were also measured. The 24 h time course of HCS mRNA in deficient rats was examined after biotin supplementation. HCS mRNA was significantly reduced during vitamin deficiency. It increased in deficient rats after biotin was injected; reaching control levels 24 h after administration. These changes seem to be the first known instance in mammals of an effect of a water-soluble vitamin on a mRNA functionally related to it. In contrast, the decreased activities of the carboxylases were associated with reductions in the amounts of their enzyme proteins except in brain. However, their mRNA levels were not affected. There are no reports on these types of vitamin affecting the mRNA or protein levels of their apoenzymes or their products. In conclusion, this work provides evidence for biotin as modulator of the genetic expression of the enzymes involved in its function as a cofactor. As such, it may be a useful model for probing a similar role for other water-soluble vitamins.

Abreviaturas

ACC	Acetil CoA carboxilasa
ATP	Adenosin-trifosfato
B-AMP	Biotinil-adenilato
BC	Carboxilasas de biotina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BCCP	Proteína acarreadora de biotina (siglas en inglés)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (siglas en inglés)
cGK	Cinasa dependiente de GMPc
CT	Transferasa de carboxilo
DMC	Deficiencia múltiple de carboxilasas
GK	Glucocinasa
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
HCS	Holocarboxilasa sintetasa
MCC	Metilmalonil CoA carboxilasa
NBT	Nitroblue tetrazolium
PC	Piruvato carboxilasa
PCC	Propionil CoA carboxilasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxicinas

INTRODUCCIÓN

Hace tiempo, se creía que consumir una dieta rica en proteínas, carbohidratos y lípidos era suficiente para mantenerse en buenas condiciones de salud; sin embargo, a principios del siglo pasado se encontraron algunos factores químicos contenidos en los alimentos, que son indispensables para el buen funcionamiento del cuerpo humano.

Entre estos factores se encuentran las vitaminas, que son nutrimentos químicos esenciales para la mayoría de los organismos superiores, que las necesitan para llevar a cabo muchas de las reacciones bioquímicas del metabolismo, ya que actúan como cofactores esenciales de una gran cantidad de enzimas que participan en las distintas rutas metabólicas.

Aunque en los organismos superiores los procesos de regulación metabólica están mediados por el sistema neuro-inmuno-endócrino, a diferencia de los microorganismos (en donde los cofactores son los que tienen un papel regulador) se sabe que existen casos en los que algunos metabolitos tienen un papel regulador, tales como el ácido retinoico, la vitamina D, o el grupo hemo. Sin embargo, poco se conoce acerca del papel regulador de las vitaminas hidrosolubles.

En estudios realizados sobre la deficiencia de biotina en la desnutrición de tercer grado se demostró que existe deficiencia de esta vitamina (a). Posteriormente se observó el mismo efecto cuando se administró esta vitamina o un placebo, en forma de "doble ciego", a niños con desnutrición de tercer grado. Las actividades de sus carboxilasas se incrementaron en mayor grado como respuesta a la administración de biotina sólo en aquellos pacientes que habían tenido las actividades enzimáticas más bajas al inicio del estudio (b), tras el cual nos surgió la duda de si era un efecto exclusivo a nivel de actividad o también habría un efecto en la masa proteica.

Lo anterior nos llevó a planteamos una pregunta más general: si un cofactor como la biotina, en un organismo complejo, es capaz de tener un papel regulador sobre la expresión genética de las enzimas con las que participa como cofactor.

Se sabe que, además de su papel como cofactores, muchas vitaminas tienen otras funciones, incluyendo la de ser reguladoras de la expresión de genes que codifican para diferentes enzimas. Esta doble función aún no ha sido estudiada para muchas vitaminas, y en particular para la biotina, a pesar de que ésta tiene una destacada participación en el metabolismo intermediario.

La biotina es requerida como cofactor para el funcionamiento de las enzimas llamadas carboxilasas. En mamíferos existen cinco carboxilasas dependientes de biotina; dos formas de acetil CoA carboxilasas (ACC-1 y ACC-2) codificadas por genes distintos y expresadas en el citoplasma y tres carboxilasas mitocondriales que son la propionil CoA carboxilasa (PCC), la metilkrotonil CoA carboxilasa (MCC) y la piruvato carboxilasa (PC). Estas enzimas catalizan reacciones clave en los procesos de gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de aminoácidos.

Recientemente se descubrió una función adicional de la biotina en eucariontes, la de regular la expresión genética de algunas proteínas específicas como glucocinasa (a nivel de RNAm), receptor de asialoglicoproteína (a nivel de proteína) y otras, pero el conocimiento acerca de esta nueva función en relación con las enzimas que intervienen en su metabolismo aún es muy escaso. Esta situación nos motivó a estudiar la biotina como regulador de las carboxilasas (PC y PCC) y la HCS (enzimas clave en el metabolismo de la biotina) en diferentes órganos de la rata.

De acuerdo con las inquietudes de investigaciones originales de nuestro laboratorio, este proyecto tuvo como objetivo la determinación del papel de la biotina en la regulación de la expresión genética de las enzimas involucradas en su metabolismo, en ratas deficientes de biotina y normales.

En el marco de esta investigación experimental, no pretendemos sacar todas las conclusiones referente al papel de la biotina como modulador de la expresión genética en todos los niveles de las enzimas que están funcionalmente relacionadas a ella; a saber el nivel transcripcional, postranscripcional, traduccional, postraduccional.

A fin de alcanzar los objetivos de este estudio experimental y para fines de presentación formal de esta disertación doctoral, dividimos este texto en tres partes importantes.

En la primera haremos algunas puntualizaciones sobre el marco teórico de la biotina: su función, su descubrimiento y su importancia para las carboxilasas, así como su papel como regulador de la expresión genética de otras enzimas. Inmediatamente después abordaremos la parte experimental con todos sus elementos partiendo no solamente de nuestros objetivos generales, sino también de la hipótesis central. Acto seguido por el análisis y discusión de los resultados así como de la formulación de las conclusiones generales.

El camino metodológico es muy diverso. Incluye técnicas como blots de estreptavidina, RT-PCR, Southern blot, entre otras.

Antes de iniciar formalmente este escrito, es importante recordar a todos nuestros lectores que por cuestiones de honestidad científica y de fidelidad al método experimental, todos nuestros experimentos fueron repetidos, comprobados y estandarizados con la finalidad de asegurar la reproducibilidad de los resultados, aunque aquí presentamos únicamente la versión final de los mismos.

ANTECEDENTES

Biotina

La biotina es un cofactor enzimático e hidrosoluble que pertenece al grupo de las vitaminas del complejo B y está ampliamente distribuida en los alimentos (1,2), ya sea en forma libre (en vegetales, leche, frutos, salvado de arroz), o unida a las proteínas a través de un residuo específico de lisina (en tejidos animales, semillas de plantas y levaduras). En 1936 F. Kögl (3) la aisló y caracterizó en levaduras como factor esencial de crecimiento. La biotina corresponde químicamente al hexahidro-2-oxo-1H-tieno [3,4-d]imidazol-4-ácido pentanoico (Figura 1).

En organismos superiores se reconoció su importancia cuando demostró proteger a las ratas de los efectos tóxicos de una dieta rica en huevos crudos (4). Más tarde se encontró que la toxicidad era debida a la avidina, una glicoproteína que está presente en la clara de huevo, la cual se une con una extraordinaria afinidad a la biotina (5). Los organismos superiores, desde las levaduras hasta el hombre, dependen por completo de la dieta para satisfacer los requerimientos de esta vitamina (6). Sin embargo, microorganismos como *E. coli* son capaces de sintetizar biotina y se presume puedan jugar un papel relevante al suministrar parte de la vitamina requerida para el metabolismo humano (1).

El descubrimiento de la biotina y la elucidación de su estructura, así como su papel en el metabolismo, comprendió extensas investigaciones durante décadas.

En 1901, el microbiólogo belga E. Wildiers observó que los cultivos de levaduras no sólo requerían de sales y glucosa para su crecimiento, sino también de un factor esencial que provenía del "mosto" de cerveza. Este factor fue llamado "bios" e inmediatamente empezaron los esfuerzos para su aislamiento (7). En los siguientes 30 años se encontró que "bios" era una mezcla de diferentes compuestos; el primero llamado "bios I", fue identificado como meso-inositol; posteriormente se aisló el bios IIA que resultó ser el ácido pantoténico y el tercer componente de la mezcla, el bios IIB, fue aislado por F. Kögl y B.

Tonnys, a partir de la yema de huevo, levaduras y preparaciones de hígado (8). Este último aislamiento condujo a la primera cristalización de un nuevo factor al cual llamaron biotina.

La estructura de la biotina fue determinada en 1942 por Du Vigneaud y colaboradores (9) y confirmada en 1943 por S. Harris mediante experimentos de síntesis total y análisis de rayos x (10).

Lardy y Peanasky (11) reportaron que la falta de biotina en ratas, disminuía la conversión de propionato a succinato en una reacción dependiente de ATP en mitocondrias de hígado y que la biotina está unida covalentemente a la PCC (12). Finalmente se encontró que la biotina se utiliza en todos los organismos vivientes como cofactor de las enzimas implicadas en reacciones de decarboxilación, carboxilación y transcarboxilación, en los que actúa como vector para la transferencia de grupos carboxilos (13,14).

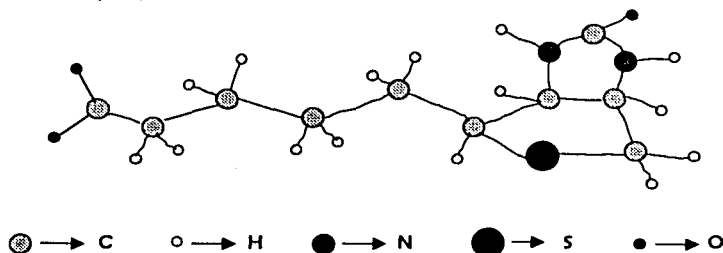


FIGURA 1. La estructura de la biotina corresponde químicamente al hexahidro-2-oxo-1H-tieno [3,4-d]imidazol-4-ácido pentanoico.

Enzimas dependientes de biotina

Las carboxilasas dependientes de biotina en células de mamíferos juegan un papel clave en los diferentes caminos del metabolismo intermedio (Figura 2), como gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y catabolismo de algunos aminoácidos (15). La PC produce oxaloacetato a partir de piruvato, para lo cual requiere acetil-CoA. Ésta es una reacción clave en el proceso de formación de glucosa a partir de precursores que no son carbohidratos. Adicionalmente tiene una función muy importante en el proceso

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

citoplasmático de lipogénesis, ya que la acetil-CoA, que no es permeable en la membrana mitocondrial y se requiere para la síntesis de ácidos grasos, se condensa en la mitocondria con el oxaloacetato produciendo citrato. El citrato, que sí atraviesa la membrana mitocondrial, pasa al citoplasma en donde se rompe en oxaloacetato y acetil CoA. De esta manera, el oxaloacetato de la mitocondria se está removiendo continuamente por la formación de citrato para la lipogénesis y reponiéndose para la actividad normal del ciclo del ácido cítrico (16). La ACC, lleva a cabo la primera reacción de la síntesis de ácidos grasos, carboxilando la acetil CoA para formar malonil CoA, la cual es utilizada por el complejo citosólico multienzimático "ácido graso sintetasa" que va a producir palmitato (17).

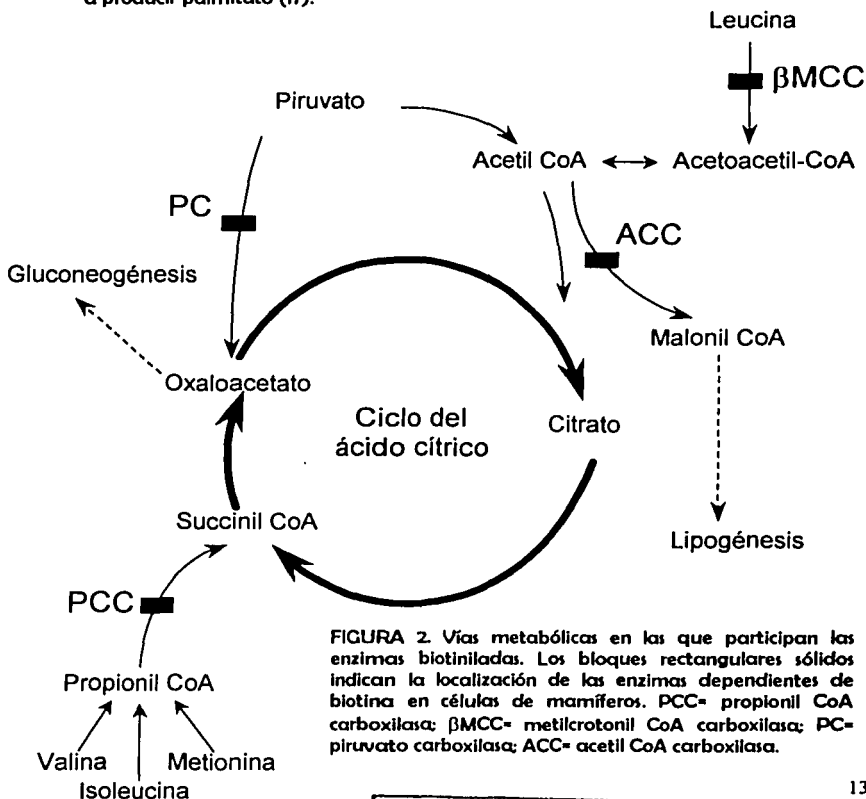


FIGURA 2. Vías metabólicas en las que participan las enzimas biotinizadas. Los bloques rectangulares sólidos indican la localización de las enzimas dependientes de biotina en células de mamíferos. PCC= propionil CoA carboxilasa; βMCC= metilcrotonil CoA carboxilasa; PC= piruvato carboxilasa; ACC= acetil CoA carboxilasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La PCC cataliza la formación de metilmalonil CoA a partir de propionil CoA. La metilmalonil CoA después se convierte en succinil CoA, y ésta subsecuentemente sufre una serie de reacciones que terminan con la producción de oxaloacetato y después, glucosa o CO₂ y agua. De esta manera, el propionato que se produce en los tejidos animales por la oxidación de ácidos grasos de cadena impar, o por la degradación de aminoácidos de cadena ramificada, -leucina, isoleucina, valina- se aprovecha tanto para la producción de glucosa como para la liberación de energía (18).

La MCC interviene en el catabolismo de la leucina, en donde se forma como intermediario el 3-metilcrotonilo y éste, por la acción de la MCC, se convierte en 3-metilglutaconil CoA, que es hidroxilado y posteriormente fragmentado para producir acetil CoA y acetato (19).

Ciclo de la biotina

Los mamíferos no pueden sintetizar biotina, de tal forma que la adquieren de los alimentos. Sin embargo, aunque se encuentra ampliamente distribuida en los nutrimentos naturales, su concentración es muy baja comparada con la de otras vitaminas. Para disponer de suficiente biotina que cubra sus requerimientos, los mamíferos han desarrollado un ciclo eficiente de la biotina para asegurar un suplemento y utilización adecuados de ésta (Figura 3).

Las carboxilasas dependientes de biotina se sintetizan en el citoplasma como apocarboxilasas, que carecen de actividad enzimática. Cada enzima está activa sólo cuando se encuentra unida covalentemente a la biotina y entonces se llama holocarboxilasa. La biotina se une a un grupo ε-amino de un residuo de lisina de la carboxilasa en su sitio activo; esta lisina está localizada en una secuencia Ala/Val-Met-Lys-Met, que es universalmente conservada en todas las enzimas dependientes de biotina (20,21).

La reacción de biotinilación de apocarboxilasas, es catalizada por la enzima holocarboxilasa sintetasa (HCS) en organismos eucariontes (22) y en procariontes por la enzima conocida como ligasa de biotina ó proteína BirA (23). Como describiremos más

adelante, estas enzimas son muy diferentes: sin embargo, ambas catalizan la reacción de biotilación mediante el mismo mecanismo.

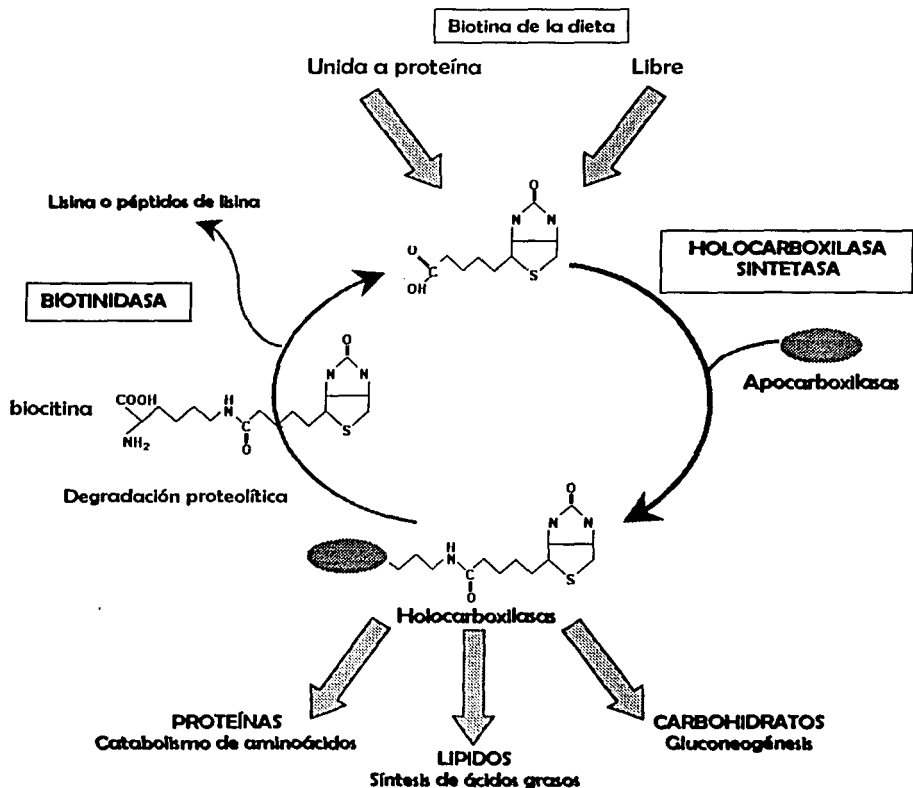
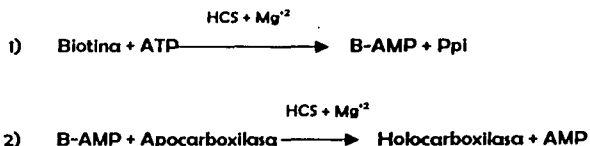


FIGURA 3. Se muestra el reciclamiento metabólico de la biotina en mamíferos. Las dos enzimas principales relacionadas con este ciclo son la holocarboxilasa sintetasa (HCS) y la biotinidasa. La HCS une covalentemente a la biotina con las diferentes apocarboxilasas para formar las holocarboxilas. La biotinidasa es la hidrolasa que libera a la biotina de la biotina y de pequeños péptidos biotilados que se formaron en la degradación proteolítica de las holocarboxilas y de la biotina unida a las proteínas de la dieta.

El proceso se lleva a cabo en dos reacciones parciales:



En la primera la biotina se activa por ATP, lo cual resulta en la formación de un intermediario conocido como biotinil-adenilato (B-AMP). En la segunda reacción el grupo biotinilo del B-AMP se transfiere a la apoenzima para formar la carboxilasa activa y se libera AMP. La misma enzima HCS cataliza estas dos reacciones parciales (24).

Uno de los productos de la degradación de las carboxilasas, durante su recambio, es la biocitina. La hidrólisis del enlace biotina-lisina de la biocitina requiere de una enzima especial, la biotinidasa. Esta enzima también se requiere para el aprovechamiento de la biotina, que proviene de la dieta, debido a que normalmente se ingiere unida a proteínas (25).

Biotinilación en bacterias

La reacción de biotinilación en bacterias está catalizada por la enzima BirA. Esta proteína es una enzima formada por tres dominios diferentes. Hacia el extremo carboxilo terminal existe una región en la que reside la actividad enzimática de biotinilación. En el extremo amino terminal existe una estructura terciaria del tipo hélice-vuelta-hélice, la cual le permite unirse de manera específica a una secuencia en el DNA. Esta última estructura tiene la función de regular la transcripción de cinco genes que están involucrados en la síntesis de biotina en *E. coli* funcionando como un represor de la transcripción de los mismos (26,27).

HCS humana

En organismos eucariontes, la HCS cataliza la biotinylación de las carboxilasas. En 1995 se clonó el DNA complementario (cDNA) de la HCS humana (28,29) y se descubrió que esta proteína está formada por 726 aminoácidos (80.75 kDa). Su RNA mensajero (RNAm) se expresa preferencialmente en riñón, páncreas y músculo esquelético. El RNAm primario de la HCS se procesa alternativamente en la célula, dando lugar a diversas moléculas de RNAm cuyas funciones no se han determinado.

Si se comparan las secuencias entre la proteína Bir A y la HCS humana, se observa una gran homología de aproximadamente 130 aminoácidos hacia el extremo carboxilo terminal de ambas enzimas. Esta región corresponde al dominio de biotinylación de Bir A. La secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de ambas enzimas no muestra similitud por lo que esta región en Bir A es la que confiere actividad transcripcional. Probablemente el hecho de que los eucariontes no pueden sintetizar biotina sea debido a la pérdida de esta estructura (30).

Deficiencia de biotina

La deficiencia de biotina trae consecuencias muy importantes para el organismo; como bloqueos en la gluconeogénesis, en la anaplerosis del ciclo de Krebs, en la síntesis y elongación de los ácidos grasos y en el catabolismo de varios aminoácidos y lípidos. Todos estos trastornos metabólicos ocasionan manifestaciones clínicas tan graves, que pueden llevar a la muerte.

La deficiencia múltiple de carboxilasas (DMC) es una enfermedad que se caracteriza por una disminución en la actividad de todas las enzimas dependientes de biotina y cuyo origen puede ser adquirido o genético. La deficiencia adquirida es el resultado de una alimentación carente de biotina, de la ingesta de grandes cantidades de clara de huevo, la cual contiene avidina, o de una alimentación parenteral total por tiempo prolongado (31-33).

La DMC de origen genético, se debe principalmente a dos clases de mutaciones, una en el gen de la HCS (34-36) y otra en el de la biotinyladasa (37,38) estos padecimientos tienen un patrón de herencia autosómico recesivo.

Biotina y expresión génica

Además de actuar como cofactor de las carboxilasas, es bien conocido que la biotina está involucrada en la regulación del operón de biotina en *E coli* (27,39) actuando como un correpresor de la transcripción del operón. Además, en mamíferos la biotina juega un papel en la proliferación y diferenciación celular, (40-42) así como en la regulación de la síntesis de ciertas proteínas, como son el receptor de la asialoglicoproteína y varias enzimas reguladoras del metabolismo de la glucosa.

En el caso de estas últimas enzimas se demostró por primera vez que una vitamina hidrosoluble produce efectos a nivel transcripcional, tanto inductor como supresor, comparable a la acción de ciertas hormonas.

Se demostró que en cultivos deficientes de biotina, el gen de la glucocinasa hepática (GK) se encuentra disminuido. Este efecto se puede restituir cuando se agrega biotina al medio de cultivo (43). Se obtuvieron resultados similares en hígados de ratas alimentadas con una dieta carente de biotina, en los que se observó una inducción (19 veces) de los RNAm de esta enzima después de la administración de biotina, en comparación con las ratas que no recibieron inyección de biotina (44). Recientemente se demostró que la biotina también tiene efectos sobre la traducción del RNAm de la GK hepática (45).

Spencer y Pilot (46), reportaron que la actividad de la glucocinasa se aumenta en cultivos de hepatocitos de rata, en respuesta a la suplementación de GMPc. Poco tiempo después se comprobó que la adición de biotina al medio de cultivo incrementa los niveles intracelulares de GMPc, así como la actividad de la glucocinasa (43).

Además de los ejemplos descritos, existe evidencia de que esta vitamina puede actuar como represor de la transcripción genética en células eucariontes. En ratas diabéticas, la administración con biotina tiene un efecto inhibitorio en la transcripción del gen de la enzima hepática PEPCK, enzima clave en la regulación de la gluconeogénesis (47).

Por otra parte, también se demostró que la biotina interviene también en la traducción del RNAm de ciertos genes. Collins (48), probó que para que el receptor de asialoglicoproteína se exprese de manera eficiente en la línea celular HepG2, es necesario estimular a estas células con biotina. La cantidad de su RNAm no se afecta, pero sí la cantidad de proteína expresada (49,50). Este mismo efecto se observó cuando se administró a las células con GMPc. Estos resultados sugieren un mecanismo común para la regulación transcripcional y traduccional por biotina.

Hasta ahora no existen estudios publicados acerca de si la biotina juega un papel regulador sobre la expresión génica de las enzimas que participan en su ciclo. En el presente trabajo presentamos las primeras evidencias de esta regulación sobre las carboxilasas y la HCS.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la biotina sobre la expresión de los genes de la holocarboxilasa sintetasa (la enzima que biotinila) y de la propionil CoA carboxilasa y la piruvato carboxilasa (carboxilasas que se biotinilan) en diferentes órganos de ratas normales y deficientes de biotina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Determinar la actividad enzimática de la PCC durante el desarrollo de la deficiencia de biotina para establecer su grado máximo.**
- **Establecer cultivos primarios de hepatocitos de ratas deficientes de biotina, en medio de cultivo sin suero y sin biotina.**
- **Observar la cinética de reactivación y rebiotinilación de la PCC y la PC al agregar biotina a los cultivos de hepatocitos deficientes.**
- **Determinar las condiciones óptimas de biotinilación de las apocarboxilasas en estudio, para poder tener las carboxilasas del homogenado en forma holo, y poder medir su masa utilizando estreptavidina acoplada con fosfatasa alcalina.**
- **Estudiar los cambios a nivel de actividad específica, proteína enzimática y RNAm de la PCC y la PC en la deficiencia de biotina.**
- **Clonar un fragmento del cDNA de la HCS de rata**
- **Cuantificar los RNAm de la HCS por RT-PCR**

HIPOTESIS

Ya que la deficiencia de biotina ocasiona una disminución proporcional de la actividad específica de dos carboxilasas, y que al agregarse biotina a células deficientes se requieren 24 horas para que se restituya la actividad de dichas carboxilasas a niveles normales, se sugiere que la biotina influye también en los mecanismos que determinan la cantidad (masa proteica) y los niveles de RNAm de PCC y PC, así como los RNAm de la HCS.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Realizamos los estudios en ratas macho de la cepa Wistar, a los que les provocamos deficiencia de biotina (ver adelante). En estas ratas determinamos el estado funcional de la biotina, midiendo la actividad específica de la PCC en hígado durante ese proceso. Además, en hepatocitos en cultivo, determinamos las actividades específicas y el grado de biotilación de las enzimas PC y PCC, al adicionar biotina y cosechar las células a diferentes tiempos.

También obtuvimos diferentes órganos (hígado, riñón, músculo y cerebro), en los cuales determinamos la cantidad total (masa proteica) de la PC y PCC y sus respectivos RNAs mensajeros. Por otro lado, evaluamos el efecto de la biotina sobre las cantidades de RNA mensajero de la HCS de los órganos arriba mencionados.

ANIMALES Y DIETA DEFICIENTE DE BIOTINA

Utilizamos ratas recién destetadas (de 21 a 28 días), con un peso aproximado de 40 a 60g, las albergamos en jaulas de plástico y las mantuvimos en condiciones estrictamente controladas de periodos de luz-oscuridad de 12 x 12 h, con agua y alimento *ad libitum*.

Fueron sometidas a una dieta comercial deficiente de biotina y enriquecida con clara de huevo, la cual contiene la proteína avidina (5t) (ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH). Por cada uno de estos animales tuvimos un control, bajo condiciones idénticas de alimentación, pero les inyectamos intraperitonealmente 0.15 M de biotina en PBS dos veces por semana.

Sacrificamos a las ratas por inyección intraperitoneal de 200 µl de pentobarbital sódico, entre la octava y la décima semana de haber empezado la dieta experimental, cuando las manifestaciones clínicas de deficiencia de biotina aparecieron (dermatitis periorificial, alopecia, salto de canguro). En un lote realizamos cultivos primarios de hepatocitos, y en otro extrajimos el hígado, el riñón, el músculo abdominal y el cerebro, los cuales congelamos a -70°C.

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

La forma de preparar las soluciones y reactivos que se usaron para las determinaciones que se describen a continuación, se encuentran especificadas en el *Apéndice A*

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Obtuvimos los hepatocitos utilizando la técnica de Berry y Friend (52), a partir de ratas normales y deficientes, cuyos hígados fueron perfundidos con una solución de Hanks sin Ca^{+2} ni Mg^{+2} a pH=7, que contiene tricina 25 mM y EGTA 0.5 mM.

Colocamos la solución en la esfera de un perfusor, el cual mantiene la temperatura de la solución a 37°C. La rata fue sacrificada, posteriormente se cortó la piel y el músculo del abdomen para luego remover las vísceras y descubrir la vena porta. A continuación realizamos una pequeña incisión en la vena y se introdujo una cánula por la que se pasaron 300 ml de la solución de Hanks para lavar el hígado, que se encontraba en la esfera del perfusor; se retiró el hígado de la rata y se colocó en el embudo del perfusor, el cual habíamos cubierto con papel autoadherible. Se recirculó una solución con colagenasa (179 U/mg) con solución de Hanks (50 ml), hasta que el hígado quedó digerido (cuando adquirió una textura pastosa). En este punto detuvimos el flujo de colagenasa y se colocó el hígado sobre una caja de Petri con solución de Hanks, donde lo disgregamos con un tubo de plástico.

Todas las soluciones contenían penicilina-estreptomicina al 1% y se mantuvieron a 37°C utilizando un baño redirculatorio.

Filtramos el hígado digerido con una malla de seda estéril y el filtrado se centrifugó a 800 rpm durante un minuto; desechamos el sobrenadante y el precipitado (hepatocitos) se resuspendió en solución de Hanks con CaCl_2 .

Para evaluar la integridad de los hepatocitos obtenidos, medimos su viabilidad con azul tripano al 0.04%. A partir de esta determinación calculamos el porcentaje de viabilidad.

CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS

Sembramos las células obtenidas del aislamiento a una densidad de 50,000 células/cm² en cajas de 8 cm². Utilizamos un sustrato de adhesión (colágena) en las cajas de cultivo para que los hepatocitos quedaran bien fijos. Irradiamos con luz ultravioleta las cajas durante 24 horas (para evitar contaminación) y se guardaron a temperatura ambiente hasta su uso.

El medio de cultivo que utilizamos fue DMEM con L-glutamina y aminoácidos no esenciales, sin NaHCO₃, sin biotina y sin suero bovino fetal. Las células se sembraron e incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂-O₂ 95-5%; después de 2 horas. Cuando las células se han adherido, les cambiamos el medio de cultivo por un medio fresco y las mantuvimos en las mismas condiciones. A las 24 horas nuevamente se les cambió el medio de cultivo e iniciamos el experimento.

Una vez realizado el último cambio del medio de cultivos, que fue el tiempo cero, añadimos 5µM de biotina a los cultivos primarios y cosechamos los hepatocitos a los 0, 5 y 30 minutos y en la 1, 3, 6, 9, 12, 18, y 24 horas, después de haber agregado la biotina. Se centrifugaron las células a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y el precipitado de hepatocitos se secó invirtiendo el tubo. Posteriormente lo guardamos a -70°C hasta el día de la determinación de la actividad y el grado de biotinilación de la PCC y la PC.

PREPARACIÓN DE LOS ÓRGANOS

Después de descongelar los órganos, los lavamos con PBS y homogenizamos en tres volúmenes de amortiguador de homogenado (al que se le agregó una pastilla de inhibidores de proteasas: *complete TM EDTA-free*. GMBH) con un politrón (Kinemática, Krienslu). La homogenización se realizó con 2 pulsos de 10 segundos cada uno, con una pausa de 30 segundos entre ellos. Entonces los homogenados se sonicaron (Branston Cell Disruptor 200, Danbury, CT) con 5 pulsos de 10 segundos cada uno, con un minuto de descanso entre ellos. Posteriormente se centrifugó a 105,000g a 2°C por 10 minutos. Descartamos la capa de grasa y el precipitado, e hicimos alícuotas del sobrenadante y las almacenamos a -70°C, para las posteriores determinaciones.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PC Y PCC

Determinamos la actividad de la PCC y PC por el método de Sweetman (53) en los homogenados de hígados de ratas deficientes, y en los hepatocitos normales y deficientes de biotina; en este último caso, el botón de las células se resuspendió en 300 μ l de amortiguador de lisis. De este homogenado tomamos 10 μ l para el ensayo de PCC y PC y 10 μ l para la determinación de proteínas.

Para la liberación de las carboxilasas mitocondriales procedimos a romper los hepatocitos (o las células del homogenado) por sonicación, al descargar en cada tubo 30 pulsos de 1 segundo con un descanso intermedio. Se mantuvieron los tubos en hielo durante la sonicación.

El ensayo se realizó en tubos Eppendorf y a cada tubo le adicionamos 10 μ l de la muestra de reacción (ATP 28.5 mM, GHS 20 mM, Propionil CoA ó Acetil CoA, 40 mM, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_2$ (3.81 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$). Después agregamos 10 μ l del homogenado celular sonicado a cada tubo; se mezclaron bien y taparon para evitar la evaporación del CO_2 proveniente del bicarbonato. Se incubó durante una hora a 37°C con agitación constante. La reacción enzimática se detuvo incorporando los tubos en agua helada y añadiendo 10 μ l de ácido fórmico al 15% y se dejaron reposar 15 minutos, destapados.

Se usó papel *Whatman* de 3 mm en tiras previamente divididas en cuadros de 2.5 x 2.0 cm; tomamos 30 μ l de la mezcla y los depositamos en el centro de cada cuadro correspondiente a su mezcla. Cada muestra se secó perfectamente con una pistola de aire durante 20 minutos, les adicionamos 30 μ l de ácido fórmico al 15% de nuevo las secamos cuidadosamente durante 30 minutos.

El papel *Whatman* se fragmentó y colocó en viales de vidrio que contienen 1 ml de metanol en dilución 1:1 con agua destilada y 7 ml de solución de Bray. Se agitaron fuertemente y llevamos a cabo la cuantificación del CO_2 radiactivo incorporado a las carboxilasas en un contador de centelleo líquido durante 10 minutos con estándares externos; esta actividad se expresó por mg de proteína.

La cuantificación de proteínas se determinó, de acuerdo con el método descrito por Lowry (54), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Las actividades específicas de las enzimas se calcularon a partir de los siguientes datos:

$$\frac{\text{dpm } ^{14}\text{CO}_2}{60 \text{ min} \times 10 \mu\text{l hom.}} \times \frac{10 \mu\text{l hom.}}{X \mu\text{g proteína}} \times \frac{10^3 \mu\text{g prot}}{1 \text{ mg proteína}} \times \frac{1 \text{ pmol}}{12.73 \text{ dpm}}$$

$$= \text{pmol } ^{14}\text{CO}_2 \text{ fijadas} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$$

Donde dpm son las desintegraciones por minuto, dato que proporciona el contador de centelleo; 60 minutos, el tiempo de incubación de la reacción; X $\mu\text{g prot.}$ es la concentración de la proteína determinada por el método de Lowry; 12.73 dpm, la actividad específica del bicarbonato radiactivo.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS POR "BLOTS" DE ESTREPTAVIDINA

Resuspendimos los botones de hepatocitos en amortiguador de lisis y posteriormente los sonicamos para extraer las proteínas; corrimos 25 μg de proteínas en un gel de SDS-poliacrilamida al 7.5% (SDS-PAGE) a 70 mAmps durante 1 hora. El gel se incubó con amortiguador de transferencia por 30 minutos en agitación suave. Posteriormente realizamos la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μm , Bio-Rad, Hércules, CA), utilizando una unidad de transferencia semiseca (Bio-Rad) a 17 V por 30 minutos. Enseguida incubamos la membrana con estreptavidina-fosfatasa alcalina, para detectar proteínas biotiniladas. Después remojuamos la membrana con 50 ml de amortiguador de bloqueo al 5% durante 1 hora, con agitación suave y posteriormente la lavamos con 80 ml de amortiguador de réplica.

Entonces incubamos la membrana en 15 ml de amortiguador de lavado y 1.5 μl de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Bio-Rad) a 37°C por 1 hora. Lavamos enseguida con amortiguador de réplica por 5 minutos cada vez y con 0.15 M de Tris-HCl, pH 8.0. El desarrollo del color se realizó incubando la membrana, en la oscuridad, con agitación lenta, en 10 ml de amortiguador A-P, que contenía 100 μl de solución de NBT y 100 μl

de solución BCIP. Una vez que aparecieron las bandas, la membrana se lavó con agua bidestilada.

DETERMINACIÓN DE LA MASA DE LA PC Y PCC

Cuantificamos la masa de las carboxilasas por blots de estreptavidina, después de biotinar *in vitro* los homogenados de los diferentes tejidos, para convertir las apocarboxilasas en holocarboxilasas. Los homogenados de las apocarboxilasas fueron biotinilados por una técnica modificada de Desjardins (54).

Añadimos 500 μg de proteína de los homogenados a la mezcla de reacción en un volumen final de 500 μl y se incubó a 37°C por 6 horas; además añadimos mezclas de ATP-MgCl₂ a la segunda y cuarta hora de incubación. Detuvimos la reacción añadiendo 500 μl de amortiguador de electroforesis y se almacenó a -2°C. El máximo grado de biotinilación de los homogenados se obtuvo optimizando las concentraciones de los reactivos y el tiempo de incubación. Los controles no biotinilados se incubaron similamente, excepto que no se añadieron biotina y ATP a la mezcla de reacción. Después, los homogenados biotinilados y sus controles se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5% (5 μg de proteína) como se describió arriba.

ANÁLISIS DE LOS RNA_m DE LA PC Y PCC

1. Extracción de RNA total

Obtuvimos los órganos de las ratas por disección y extrajimos el RNA total por el método de Chomczynski y Sachi (55) el cual utiliza el reactivo trizol, que es una solución monofásica de fenol ácido e isotiocianato de guanidina, que mantiene la integridad del RNA durante la homogenización del tejido.

Homogenizamos 100 mg de tejido en 1 ml de trizol a 4°C en el politrón. El homogenado se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos núcleo proteicos.

Agregamos 200 μ l de cloroformo por cada ml de homogenado, se agitaron por 30 segundos y se incubaron en hielo por 5 minutos; centrifugamos a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos y obtuvimos tres fases: la inferior, de color rojo, compuesta por fenol-cloroformo, una interfase, y la porción superior acuosa incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantuvieron en la interfase y la fase orgánica respectivamente.

Transferimos la fase acuosa a otro tubo, agregamos un volumen equivalente de isopropanol y conservamos la muestra a 4°C por 15 minutos. Después de centrifugar se obtuvo la pastilla correspondiente; ésta se lavó con etanol al 75% y al 80%. Secamos la pastilla en un horno con vacío a temperatura ambiente, por 10 minutos. Disolvimos la pastilla de RNA en 50 μ l de agua des-ionizada estéril tratada con DEPC (dietil-pirocarbonato). Para cuantificar la concentración de RNA total tomamos una alícuota de cada muestra y medimos la absorbancia a 260 nm.

Para comprobar la integridad del RNA, tomamos 20 μ g de RNA total de cada uno de los hígados (normales y deficientes) y los analizamos por electroforesis en geles desnaturizantes de agarosa al 1% y formaldehído en amortiguador de corrida (MOPS 50 mM/EDTA 1 mM). Los geles se corrieron, aplicando una corriente de 100 V, durante 1.5 horas hasta que el colorante del amortiguador de carga llegó a 3 cm del borde. Por último se observaron las bandas en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta.

2. Análisis por RT-PCR de los RNAm de la PC y PCC

Tomamos 4 μ g de RNA total de los homogenados normales y deficientes de biotina para sintetizar el cDNA. La mezcla de reacción para la transcripción reversa tenía: el RNA, 200 μ M de dATP, dCTP, dTTP y dGTP, Buffer de RT 5X, DTT 4 mM, oligo d(T) y la enzima RT-M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse transcriptase) de 40 U. Incubamos la reacción durante 1 hora a 37°C. Después tomamos 10 μ l de esta reacción y realizamos el PCR para amplificar los fragmentos de los genes de PC y PCC. Otros 10 μ l del cDNA los utilizamos para amplificar simultáneamente un fragmento del gen de actina, el cual utilizamos como un control de expresión constitutiva.

La secuencia de los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la PC de rata fueron 5'-(ACT TGT ATG AGC GGG ACT GC)-3' para el sentido y 5'-(TGA CCT TGA

CGG GGA TTG GA)-3' para el antisentido. Los oligonucleótidos utilizados para cuantificar el segmento de PCC fueron 5'-(GA TGC CAG CTG TGA TGT)-3' en el sentido, y 5'-(GAG GCC TTG ATC ATC ACA GG)-3' para el antisentido. La secuencia de oligonucleótidos del gen constitutivo (actina) fueron 5'-(GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG)- 3' en el sentido, y 5'-(GGT CTC AAA CAT CAT CTG GG)-3' para el antisentido. Los oligonucleotidos se diseñaron utilizando el programa OLIGO 4.

La mezcla de reacción para el PCR contenía los oligonucleótidos, 0.5 mM de cada uno, *buffer* 10X, MgCl₂ 1.5 mM, 200 μM de dATP, dCTP, dTTP y dGTP, Taq polimerasa (4 U) en un volumen final de 50 μl. Las muestras se incubaron en un termociclador (Perkin Elmer 480) con diferentes condiciones de temperatura, de acuerdo al gen. Después de una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, realizamos el PCR como sigue:

Para PC 1 ciclo a 95°C por 3 minutos,
 30 ciclos a 95°C/1 minuto, 60°C/1 minuto, y 72°C/1 minuto
 1 ciclo a 72°C por 7 minutos
 24 horas a 4°C constante

Para PCC
 1 ciclo a 95°C por 3 minutos
 30 ciclos a 95°C/1 minuto, 57°C/1 minuto, y 72°C/1 minuto
 1 ciclo a 72°C por 7 minutos
 24 horas a 4°C constante

Terminada la incubación de las muestras, las almacenamos a -20°C hasta que se analizaron.

Para cada experimento, se tuvieron controles como: un blanco sin RNA, un blanco sin RT, para descartar cualquier posibilidad de contaminación con DNA genómico. De igual manera realizamos curvas de ciclos y de temperaturas para cada gen (datos no mostrados; para mayor información consultar las bitácoras experimentales en la Unidad Genética de la Nutrición, IIB, UNAM).

3. Análisis de los productos de PCR por "southern blot"

Tomamos 10 μ l de los productos de PCR de cada muestra y los separamos por electroforesis, en geles de agarosa al 1.1% en amortiguador de TAE. Después de la electroforesis, transferimos el gel por capilaridad a membranas de nitrocelulosa, (Genescreen, NEN Research Products, Dupon) con SSC 10X por 18 horas. Las membranas se prehibridaron en 0.2 ml/cm² con la siguiente solución: formamida 50%, SDS 0.2%, EDTA 0.01 M, SSC 2X, PBS 0.12 M pH=6.5, Denhardt 4% y DNA de esperma de salmón, 100 μ g/ml; por 24 horas a 42°C.

Después de la prehibridación, las membranas se hibridaron con los DNA complementarios (cDNA) de la PCC y la PC, los cuales marcamos radiactivamente con dCTP α -³²P por la técnica de "Megaprime" (ver adelante).

Incubamos las membranas con 0.1 ml/cm² de la solución de prehibridación en presencia de la sonda radiactiva a 42°C durante toda la noche. Después de la hibridación, lavamos las membranas en condiciones de alta astringencia a temperatura ambiente en una solución de SSC 2X y posteriormente en una solución de SSC 0.1X-SDS 0.1% a 58°C. Se expusieron en placas autorradiográficas de imagen científica X-OMAT AR (XAR-2) (20.3 x 25.4 cm) con pantalla intensificadora de uno a tres días a -70°C. Esta técnica también se realizó para la actina, que fue nuestro control de expresión.

4. Marcaje de la sonda (Megaprime)

El marcaje de la sonda lo realizamos por el método de "random prime" utilizando el kit comercial Megaprime DNA Labelling System (Amersham), en el cual mezclamos 50 ng de DNA con 5 μ l de *primers* (oligonucleótidos de secuencias "random") y 23 μ l de agua, los cuales desnaturalizamos calentando a 100°C por 5 minutos, posteriormente añadimos el amortiguador de marcaje, el dinucleótido marcado y la enzima; mezclamos suavemente e incubamos por 1 hora a 37°C. Detuvimos la reacción añadiendo 5 μ l de EDTA 0.2M

5. Análisis densitométricos

Analizamos las placas autorradiográficas de las hibridaciones, en un densitómetro de imagen Scan Jet 3c (Hewlett Packard). Por este método se obtuvo el área bajo la curva correspondiente a la señal de hibridación de los productos de PCR de la PCC, la PC y la actina para cada muestra. Para conocer la expresión relativa del RNA de cada una de las proteínas respecto al control de expresión, se asignaron unidades arbitrarias a los valores de las áreas bajo la curva y se graficaron como una relación PCC/actina, PC/actina. (57)

ANÁLISIS DE LOS RNA MENSAJEROS DE LA HCS

1. Clonación de un fragmento de cDNA de la HCS de rata

Debido a que el gen de la HCS de rata no se ha clonado, nos propusimos obtener un fragmento de este gen a partir de hígados de ratas normales para poder realizar las determinaciones de los RNAm. Después de extraer el RNA total por el método de Chomczynski antes mencionado, purificamos el RNAm utilizando columnas de celulosa Oligo (dT). Por otra parte, diseñamos oligonucleótidos degenerados cuyas secuencias estaban conservadas entre diferentes especies distantes. Para este fin, realizamos un alineamiento de las secuencias de HCS de levadura y ser humano (*Apéndice B*), para encontrar las regiones más conservadas. Además, utilizamos la tabla de uso de codones para obtener las secuencias menos degeneradas: en el sentido 5' AAG TGG CCC AAC GAV(C/T) ATT TAV; en el antisentido 5'-GTC GAA GGA GTT GCC GTC CCG-3'. Realizamos un RT-PCR, para obtener el fragmento de cDNA de rata de HCS, utilizando los oligonucleótidos arriba mencionados y el RNAm purificado, a 35 ciclos y una TM (temperature melting) de 55°C. Los productos del RT-PCR los analizamos por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % y el fragmento del tamaño esperado (447 pb) lo purificamos con el kit GeneClean II. Una vez que obtuvimos el fragmento de HCS, se secuenció y se diseñaron nuevos oligonucleótidos. La secuencia final de los oligos fue, en el sentido 5' TAC AGC CTC TAT GAA GAT CG 3', y el antisentido 5' CTC CAC ACC CCA CCA CC 3'.

2. Análisis por RT-PCR de los RNAm de HCS

Obtuvimos el RNA total de los diferentes órganos de las ratas controles y deficientes por la técnica de TRIzol (antes descrita). Realizamos la transcripción reversa de 4 µg de RNA total (como describimos para PC y PCC) y utilizamos 10 µl de la reacción de RT para amplificar el fragmento de cDNA de la HCS. Los otros 10 µl del cDNA los utilizamos para amplificar simultáneamente un fragmento del gen de la actina (control constitutivo). El PCR del fragmento de cDNA de la HCS se realizó a 30 ciclos. El ciclo de temperaturas fue 95°C, 50°C, y 72°C por 1 minuto cada una, con una extensión terminal a 72°C por 5 min. El número de ciclos realizados fue dentro de la fase exponencial del proceso de amplificación, el cual se determinó previamente. Los productos de PCR fueron separados sobre un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y posteriormente los analizamos por la técnica de *southern blot*. Transferimos el gel a una membrana de *Gene Screen*, los hibridamos con su sonda marcada, (ver arriba) y después las membranas se expusieron en un film Hyperfilm βMax por 24 horas a -70°C. Los niveles aproximados de los RNAm de la HCS los estimamos de las intensidades de las bandas en la autorradiografía, las cuales las cuantificamos por densitometría. Los datos se normalizaron con los niveles del RNAm de la actina. Realizamos análisis estadísticos utilizando la prueba T de *student*.

3. Efecto "curso temporal" de la biotina sobre los RNAm de la HCS

Inyectamos intraperitonealmente seis ratas deficientes de biotina con 200 µg de biotina en PBS 1.0 M (pH=7). Las sacrificamos a diferentes tiempos: 0 y 30 minutos, 1, 2, 4, y 24 horas, obtuvimos los hígados y los almacenamos a -70°C. El RNA total se extrajo utilizando TRIzol y realizamos también análisis de RT-PCR como describimos arriba.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DEL ESTADO NUTRICIO DE BIOTINA

Se observó deficiencia de biotina desde las dos semanas de haber sometido a las ratas a la dieta carente en biotina y con avidina. La deficiencia se comprobó monitoreando la actividad específica de la PCC, la cual disminuyó gradualmente durante el desarrollo de la deficiencia. La figura 1 muestra los resultados de un experimento representativo en el que siete ratas fueron sacrificadas a diferentes tiempos después de que se alimentaron con la dieta deficiente. Aproximadamente entre la octava y novena semana, las ratas presentaban síntomas característicos de deficiencia tales como alopecia, dermatitis periorificial, conjuntivitis y "salto de canguro"; además del retraso del desarrollo muy notorio en comparación de los animales normales (figura 2). Por otro lado, la excreción urinaria de ácido 3-hidroxisalícílico aumentó sustancialmente después de la tercera semana de administrar la dieta deficiente (figura 1)

Al mismo tiempo, también se obtuvieron ratas controles: ratas con idéntico tratamiento que el de las ratas deficientes de biotina pero que fueron suplementadas con biotina por vía intraperitoneal (0.15 M en PBS) 2 veces por semana.

AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS

Debido a las condiciones de nuestras ratas, se tomó una serie de medidas, de manera que los hepatocitos pudieran sobrevivir por lo menos 24 horas en cultivo in suero y sin biotina. Estos fueron aislados de las ratas por la técnica de Berry y Friend. Al ser sacrificadas las ratas controles pesaron de 500-600g y las ratas deficientes de 200-400g. Los animales fueron sacrificados por inyección intraperitoneal de 200 μ l de pentobarbital sódico.

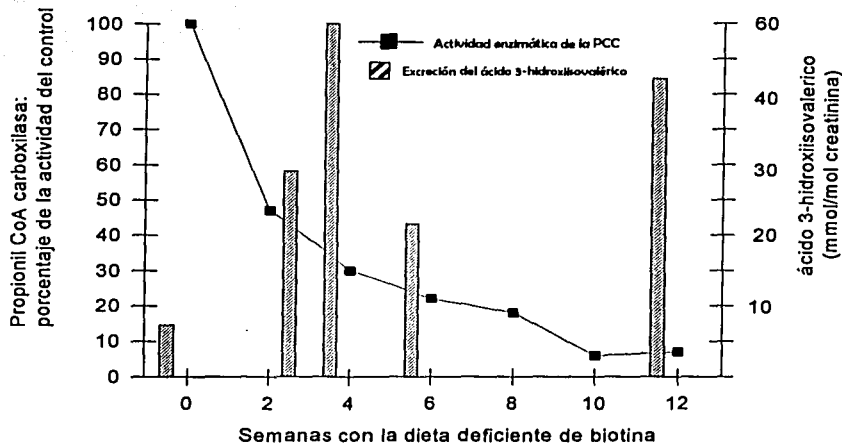


FIGURA 1. Cambios enzimáticos y metabólicos durante la deficiencia de biotina. La línea muestra el porcentaje de actividad de la PCC en hígado de ratas deficientes, relativo al control (3200 ± 283 pmol CO_2 fijado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína) en varios estados de deficiencia de biotina. Las barras verticales muestran la excreción urinaria del ácido 3-hidroxi-isovalérico durante el periodo experimental.

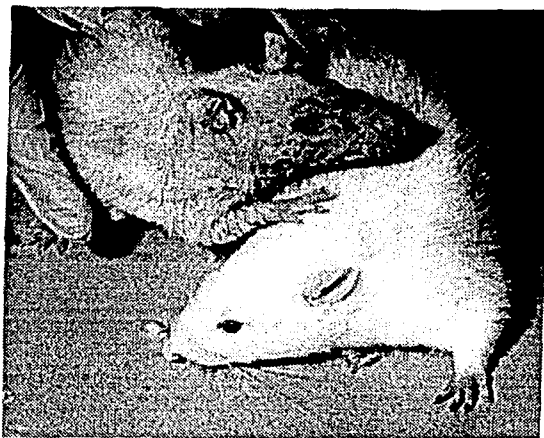


FIGURA 2. Ejemplo de una rata control y una deficiente de biotina a la semana nueve desp de empezar la dieta. Las ratas presentaban síntomas característicos de deficiencia muy ck como alopecia, dermatitis periorificial, conjuntivitis y "salto de canguro", además del retraso desarrollo muy notorio en comparación con los controles.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tras varios intentos de cultivarlos en cajas, encontramos que añadiendo una matriz de colágena, los hepatocitos podían adherirse a la caja con mayor facilidad. Al preparar los hepatocitos, la viabilidad de los mismos para las ratas controles fue de entre 90 y 95% y para las ratas deficientes fue de entre 70 y 80%.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PC Y PCC, Y DE ENZIMAS BIOTINILADAS EN CULTIVOS DE HEPATOCITOS DEFICIENTES AL AÑADIR BIOTINA

El experimento consistió en medir la actividad de la PC y la PCC presente en los hepatocitos deficientes de biotina a diferentes tiempos, después de agregar la biotina, la actividad de la PC aumenta rápidamente y casi alcanza los niveles de los controles a la 2 horas (figura 3A). En cambio, la actividad de la PCC aumenta mucho más lentamente, y requiere 24 horas para alcanzar la actividad normal (figura 3B).

Cuando se realizaron análisis de *blots* de estreptavidina de proteínas biotiniladas, se obtuvieron resultados similares (figura 4). Las bandas correspondientes a la holo-PC de las células deficientes alcanzaron una intensidad similar a los controles en una hora, mientras que la intensidad de la holo-PCC se mantuvo baja aún después de las 24 horas de la adición de biotina. No hubo cambios importantes en las bandas de las células controles después de la adición de biotina a los cultivos (resultados no mostrados).

Es importante señalar que las subunidades de PCC y MCC que unen biotina tienen pesos moleculares similares, (72,000 y 76,000 Da, respectivamente) y por lo tanto se separan muy poco en un gel de SDS-PAGE, aún usando un gel a bajas concentraciones (7.5%). Así, MCC también fue biotinilado muy lentamente. Debido al tiempo de corrimiento electroforético, la ACC, cuyo peso molecular es mucho más grande (260,000 Da), no fue visualizado.

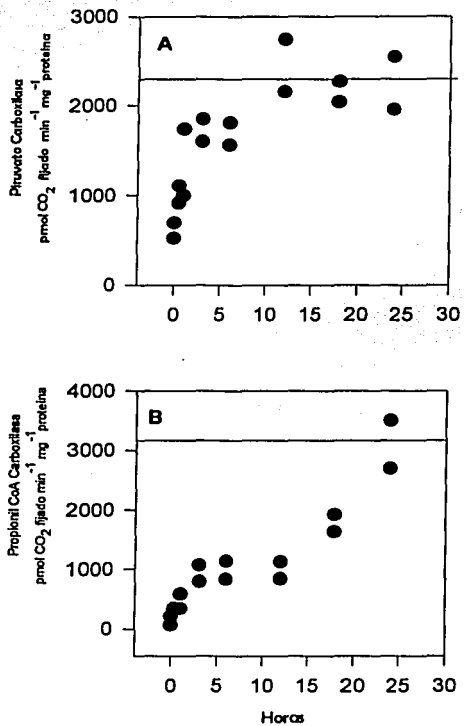


FIGURA 3. Cinética de reactivación de PC (A) y PCC (B) después de añadir biotina a cultivos de hepatocitos deficientes (línea horizontal: actividad normal). Cada punto representa una rata.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

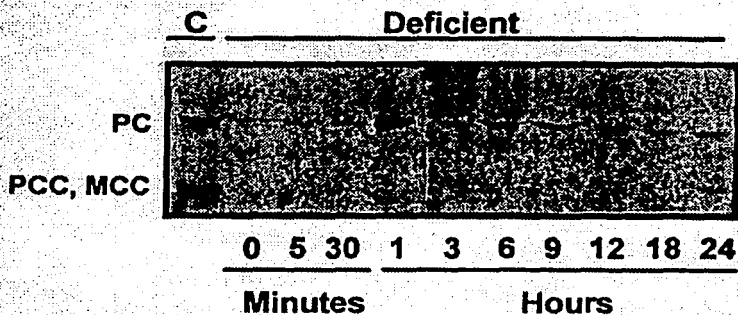


FIGURA 4. Análisis por *blots* de estreptavidina de hepatocitos deficientes de biotina a los cuales se les agregó esta vitamina y se cosecharon en diferentes tiempos (0, 5, y 30 minutos; 1, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas. C: control, PC: piruvato carboxilasa, PCC: propionil CoA carboxilasa, MCC: Metilcrotonil CoA carboxilasa (esta enzima migra a la misma altura que la PCC). Los tiempos se refieren a los periodos que se dejaron incubando las células con la biotina.

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BIOTINA SOBRE LAS CARBOXILASAS MITOCONDRIALES.

Las actividades de la PC y PCC presentaron una disminución estadísticamente significativa en los órganos de las ratas deficientes (figura 5 y 6). Estas diferencias generalmente estuvieron asociadas con cantidades significativamente bajas de sus proteínas enzimáticas. En el cerebro, la masa de PC y PCC no difiere entre los grupos y su disminución en actividad fue moderada.

Las cantidades de RNAm de PC y PCC (determinadas por análisis densitométrico, ver páginas 30-31) no cambiaron significativamente en los órganos estudiados (figuras 5 y 6).

ANÁLISIS DE LOS RNAm DE LA HCS EN LA DEFICIENCIA DE BIOTINA

-Clonación de un fragmento del cDNA de la HCS de rata

Para clonar el fragmento del cDNA de la HCS de la rata, alineamos 2 secuencias conocidas de este gen (Apéndice B), de *Sacharomyces* y ser humano, a partir de las cuales escogimos regiones conservadas. Después, utilizando oligonucleótidos degenerados, dedujimos la región esperada. Este nuevo fragmento es similar en 80% respecto a pares de bases y un 95% respecto a aminoácidos comparado con la secuencia humana (figura 7).

-Análisis de los RNAm de la HCS

Considerando nuestra pregunta de investigación de que si la deficiencia de biotina afecta los niveles de RNAm de la HCS, encontramos que presentaron una disminución significativa en los cuatro órganos de los animales deficientes de biotina estudiados a diferencia de los controles (tabla 1). Estas diferencias fueron más marcadas en el hígado y riñón que en músculo y cerebro (figura 8). Cuando la biotina se inyectó en las ratas deficientes, la cantidad de los RNAm de la HCS en el hígado, aumentó hasta cerca de los niveles normales. Sin embargo, éste fue un efecto retardado, ya que aparentemente se dio a las 24 horas después de la administración de la vitamina. (figura 9).

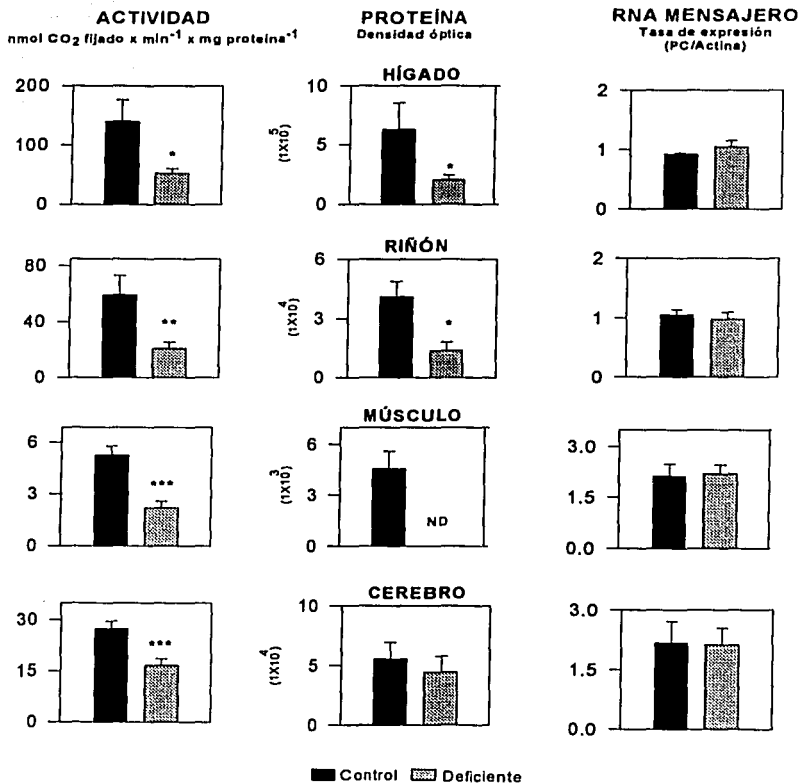


FIGURA 5. Efecto de la deficiencia de biotina sobre la actividad, masa de las carboxilasas y niveles de RNAm de la PC en órganos de ratas alimentadas con una dieta control o deficiente de biotina. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.005$ contra el control. ND, no se detectó. Ver datos completos en el Apéndice C.

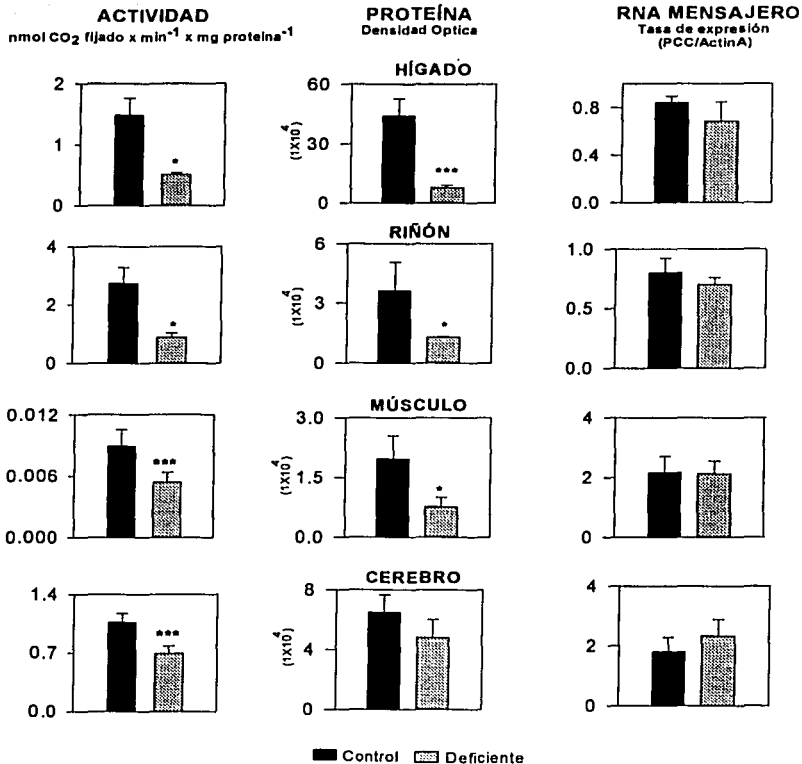


FIGURA 6. Efecto de la deficiencia de biotina sobre la actividad, masa de las carboxilasas y niveles de RNAm de la PCC en órganos de ratas control y deficientes de biotina. La proteína (panel central) incluye MCC ya que esta co-migra con la PCC. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.005$ contra control. Ver datos completos en el Apéndice C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

```

5'-TACAGCCTCT ATGAAGATCGGC GGGGTTCTGGTT AATCAACACTT GTG
  T A S M K I G G V L V N S T L V
  GGAGAAACATTT TATATCCTCATT GGCTGTGGATTC AATGTGACTAAC
  G E T F V I L I G C G F N V T N
  ACCAATCCTACC ATATGTATCAAT CACCTCATCGAA GAACACAATAAG
  S N P T I C I N D L I E E H N K
  CAGAACAAAGCCA GGCCTGAAGCCC TTACGAGCCGAC TGCTCATAGCC
  Q N K A G L K P L R A D C L I A
  AGGGCTGTGACC GTGCTGGACAAA CTCATTGACAGG TTCAGGACCAA
  R A V T V L E K L I D R F Q D Q
  GGGCCGACGGC GTTCTCCCCTG TATTATAAATAC TGGGCGCACAGT
  G P D G V L P L V K V W A H S
  GGTACGCAAGTC CGCCTGGGACG AGCGAGGGGCCA CCGGTGCTATC
  G O O V R L G S S E G P P V S I
  GTGGGTCTGAT GATTCCGGGTTT CTGCAGGTCCAC CAAGAGGGTGGT
  V G L D D S G F L Q V H Q E G G
GGGGTTGTGAGC GTGCATCGGAC GCCAACTCCTTT G.3'
  G V V S V H P D G N S F

```

FIGURA 7. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos derivados del fragmento clonado del cDNA de la HCS de rata. El fragmento corresponde a la secuencia de HCS humana entre los aa 570 y 717. La secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados para el análisis de RT-PCR se muestran en letra negra

TABLA 1

Efecto de la deficiencia de biotina sobre los niveles de RNAm de la HCS en diferentes órganos de la rata¹

Organos	Control		Deficiente de Biotina		% del Control
	n		n		
Hígado	5	7.24 ± 1.78	5	3.06 ± 1.84*	40.0
Riñón	4	2.40 ± 1.01	4	0.55 ± 0.21*	23.0
Músculo	3	17.78 ± 1.34	4	12.83 ± 0.92*	72.2
Cerebro	4	3.14 ± 0.22	4	1.70 ± 0.26*	54.1

¹Los valores son el promedio ± SD de las densidades ópticas obtenidas del densitómetro. *Diferente del control, $p < 0.05$

LIVER KIDNEY MUSCLE BRAIN
C D C D C D C D

HCS



ACTIN



FIGURA 8. Análisis por RT-PCR de los niveles de RNAm de la HCS de hígado, riñón, músculo y cerebro de ratas controles y deficientes de biotina. C, control; D, deficientes de biotina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

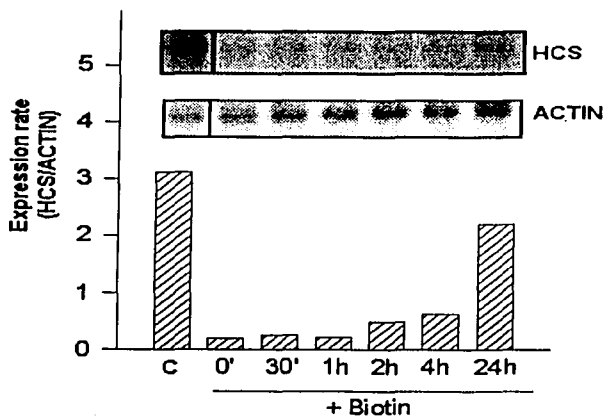


FIGURA 9. Efecto "curso temporal" de la biotina sobre los niveles de los RNAm d la HCS en hígados de ratas deficientes de biotina. C, control

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Los resultados que obtuvimos del presente trabajo aportan evidencias de que la biotina, además de su papel como cofactor de las carboxilasas, regula la expresión genética de las enzimas con las cuales esta vitamina se halla relacionada funcionalmente. La regulación de las carboxilasas (PC, PCC), parece estar mediada postranscripcionalmente, ya que no observamos cambios asociados a la deficiencia de biotina en los niveles de RNAm de estas enzimas. La regulación de la HCS podría ser a nivel de la transcripción (ver etapas descritas abajo) o procesamiento y/o estabilidad del RNAm (regulación postranscripcional). A este respecto, los cambios de RNAm de la HCS que encontramos parecen ser la primera instancia conocida en mamíferos de un efecto de una vitamina hidrosoluble sobre los RNAm de una enzima que actúa directamente sobre esa vitamina.

Desde el primer resultado obtenido en este trabajo (58), se hizo evidente la regulación de la biotina sobre las carboxilasas. Cuando analizamos los cambios en la actividad enzimática de la PCC y de la PC (figura 3) al agregar biotina a cultivos primarios de hepatocitos derivados de ratas deficientes de esta vitamina, encontramos que la PC se activa muy rápidamente, en la primera hora después de agregar biotina; por el contrario, la actividad de la PCC que se encontraba muy deficiente, en la primera hora se incrementó pero sólo a una tercera parte de lo normal y necesitaron transcurrir cerca de 24 horas para alcanzar los niveles de actividad de los hepatocitos de ratas normales.

La explicación de estos resultados se hizo aparente cuando estudiamos el grado de biotinilación de estas enzimas y donde obtuvimos el mismo comportamiento (figura 4). Una posible explicación es que las células deficientes tienen menor cantidad de apocarboxilasas (y no sólo de actividad), la que debe sintetizarse (y no sólo biotinilarse) en las siguientes 24 horas, para recuperar sus niveles normales; incluso quizá también estén afectados sus RNAm.

Debido a lo anterior esto entonces determinamos la cantidad de apocarboxilasas totales presentes en homogenados deficientes de biotina, pero esta vez quisimos estudiar

otros órganos además del hígado. Se estudiaron: el riñón (órgano que comparte con el hígado su capacidad gluconeogénica y, por lo tanto, la importancia de la PC), músculo (órgano consumidor principalmente de ácidos grasos como combustible, en el que la PC tiene un rol menos relevante) y cerebro (órgano con una actividad anaplerótica muy importante) y para ello utilizamos el método que consiste en blots de estreptavidina, después de biotinar *in vitro* los homogenados estudiados para convertir a las apocarboxilasas no biotiniladas en holocarboxilasas con biotina, que pudiesen detectarse con estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina.

Con estas técnicas demostramos que la masa de la PC (figura 5) y la PCC (figura 6) disminuye significativamente durante la deficiencia de biotina en el hígado, riñón y músculo, por lo tanto, estos estudios excluyen la conversión de "apo" a "holo" como una base para su activación como se ha descrito previamente (59,60)

Debido a que los niveles de RNAm de la PC y PCC no cambiaron en los órganos deficientes de biotina con respecto a los controles (figura 5 y 6), la regulación de estas proteínas por su cofactor podría ser ejercida en algún nivel desde el transporte del RNAm al citoplasma, la velocidad de síntesis de la proteína, la degradación de la proteína, modificaciones postraduccionales, etc. (61).

Entonces, es probable que las apocarboxilasas sean más lábiles y por lo tanto se degraden más rápido que su forma "holo". El probable aumento en la degradación de estas enzimas, no es un mecanismo nuevo, se ha observado también con la enzima ornitina aminotransferasa, una enzima que contiene el piridoxal fosfato en ratas deficientes de piridoxal (62) y para enzimas dependientes de NAD, tales como la deshidrogenasa láctica y la glutámico deshidrogenasa en el intestino de ratas deficientes de niacina (63), así como con las enzimas que utilizan como cofactor al FAD (64), el cual estabiliza a varias Acil CoA deshidrogenasas en ratas deficientes de riboflavinas. Teniendo como antecedente esto, será necesario determinar la estabilidad de las carboxilasas en la deficiencia de biotina.

Otra explicación es que la deficiencia de biotina disminuya la síntesis de las carboxilasas, por lo cual se tendrían que hacer ensayos de "pulso y caza" utilizando

metionina marcada con ^{35}S , para que después la proteína recién sintetizada se inmunoprecipite con un anticuerpo específico y se analice por SDS-PAGE.

Un punto importante a analizarse también, es la determinación de la eficiencia de la traducción de los RNAm de las carboxilasas en ausencia de biotina, ya que la disminución en la concentración de proteína enzimática y la presencia normal de RNAm podría ser la causa de la inhibición de la traducción o de procesamientos post-traduccionales. También será necesario cuantificar otra proteína no biotinilada, lo cual nos indicaría si es un efecto general sobre el sistema de traducción *per se*.

En cuanto al cerebro, los datos nos arrojaron un comportamiento diferente, ya que tanto la cantidad de PC como la de PCC no se ven afectadas durante la deficiencia. Una causa podría ser que las concentraciones de biotina se mantienen normales localmente, con una menor reducción de las actividades de las carboxilasas, respecto a otros órganos; además de que se mantuvieron las concentraciones de holo-PC y holo-PCC en los cerebros de las ratas deficientes (datos no mostrados). Será necesario identificar aquellas rutas en el metabolismo de biotina en el cerebro; por ejemplo, su transporte a través de la barrera hematoencefálica, que pudiera contribuir a que este órgano sea "privilegiado" durante la deficiencia de biotina.

Por otra parte, además de todo lo mencionado, es necesario tomar en cuenta la importante función que tiene la HCS en la conversión de apocarboxilasa a holocarboxilasa y saber si ésta se afecta en la deficiencia de biotina.

En este estudio no fue posible determinar la actividad de la HCS, ya que no existe en la actualidad un método confiable y sensible (apenas se está desarrollando uno, el cual utilizará al sustrato p67 (65) que ha sido aislado recientemente), tampoco existe la proteína purificada como para poder obtener anticuerpos y utilizarlos en la técnica de western blot para averiguar si la masa proteica se ve afectada. Sin embargo, lo que sí pudimos determinar fueron los niveles de RNAm gracias a que clonamos un fragmento del mismo a partir de hígado de rata (figura 7).

Por la técnica de RT-PCR, pudimos observar dos aspectos, primero que la cantidad de RNAm de la HCS está disminuida significativamente en la deficiencia de

biotina (tabla 1, figura 8) y segundo, que cuando inyectamos biotina a ratas deficientes, el mensajero aumentó, pero en forma gradual, al principio casi imperceptible. Apenas a las 24 horas (figura 9) después de la administración de la vitamina, el RNAm de la HCS alcanzaba niveles similares a los observados en los órganos de las ratas controles.

Por lo anterior es claro que la biotina participa en la regulación de la expresión genética para las que es cofactor, en especial en la que es uno de sus sustratos (la HCS). Pero aquí el efecto no es directo, dado el largo lapso de tiempo para que ocurra, lo que indica que se requiere un procesamiento metabólico, posiblemente asociado a la síntesis de proteínas y en el que quizá intervengan mecanismos de señalización intracelular, ya que es sabido que la biotina aumenta la actividad de la guanilato ciclasa y las concentraciones de GMPc. En otras palabras, con la deficiencia de biotina posiblemente se afecte la velocidad de síntesis del transcrito, su estabilidad o velocidad de su procesamiento por lo que se tendrán que realizar estudios, como determinar la tasa de transcripción por ensayos de run off.

Lo que sí podemos considerar son algunas conjeturas o posibilidades, que se enumeran a continuación, ya que existe información en la literatura de que la biotina regula la expresión de otras proteínas, incluso a nivel transcripcional.

1. Aunque todavía no ha sido demostrado, es probable que la biotina actúe directamente sobre un factor de transcripción y éste a su vez regule la expresión de las enzimas, por lo que será necesario identificar y caracterizar las proteínas que interactúan con la región promotora del gen, estudiar las interacciones *cis* y *trans* y buscar las señales de transducción que regulen a este promotor.

A nivel transcripcional se podría estudiar el efecto de la biotina por mutagénesis dirigida para definir el área de contacto de las proteínas *trans*, responsables de este efecto. Será necesario caracterizar a las proteínas *trans* por medio de la técnica de cambio de movilidad ("mobility shift assay"). Para verificar la interacción *cis-trans* se podría llevar a cabo un estudio de Dnase footprinting en extractos de proteínas nucleares.

2. Otra posibilidad es que la biotina ejerza su papel regulador unida al AMP, es decir, en la forma de adenilato de biotina, lo que nos trae a la mente el sistema de regulación por biotina en *E coli* como ya se mencionó en los Antecedentes, la expresión de los genes del operón-bio se reprimen cuando hay niveles altos de biotina intracelular. Cuando la proteína ACC disminuye, el biotinil-AMP se une a la ligasa (Bir A) y este complejo se une al operador del operón de biotina, reprimiendo la transcripción.

Así, la enzima que cataliza la modificación postraduccional de la ACC es también el represor del operón de biotina y la biotinil-AMP es el correpresor. Este sistema regulador está diseñado para ajustar la necesidad de la síntesis del cofactor a la tasa de síntesis de apoenzima. Sin embargo, sabemos que los organismos superiores perdieron la potencialidad de sintetizar biotina y conocemos que la HCS no posee dominios que le permitan actuar como un factor de transcripción, como su homólogo Bir A. Lo cual nos hace dudar de un mecanismo similar, a pesar de que existe una extraordinaria conservación evolutiva de las ligasas de biotina y la HCS.

3. De acuerdo con varias referencias citadas recientemente, es posible que el efecto sea a través de una vía de señalización iniciada por GMPc, ya que se ha demostrado (ver Antecedentes) que la transcripción de los genes como PEPCK, que responden a biotina es también inducida incubando los cultivos celulares con GMPc. Estos resultados sugieren las posibilidades de que la biotina y el GMPc actúen mediante el mismo mecanismo o que el efecto de la biotina sea mediado a través de cambios en los niveles de GMPc vía la activación de la guanilato ciclasa (GC).

El mejor ejemplo del efecto de la biotina sobre la expresión genética es sobre el del receptor de asialoglicoproteínas (ASGR). Se demostró que el aumento en la concentración de GMPc estimula a la enzima cinasa dependiente de GMPc (cGK) y que ésta a su vez promueve la fosforilación de una proteína COPI la cual se une a la región 5' del RNAm del receptor de asialoglicoproteína estimulando su traducción en células en cultivo (66,67). Este efecto traduccional no es necesariamente incompatible con una acción génica de la biotina. Es posible que el efecto primario de la biotina sobre el receptor de la asialoglicoproteína se efectúe a través de un incremento de la

transcripción de la proteína de unión al RNAm y que el aumento de esta proteína, a su vez, produzca secundariamente el incremento observado sobre el receptor.

Es importante puntualizar que la regulación transcripcional y traduccional mediada por biotina parece efectuarse a través del aumento en la concentración de GMPc; lo cual sugiere un mecanismo común para la regulación transcripcional y traduccional por biotina.

4. Como ya dijimos, un denominador común observado en la expresión de la glucocinasa y el receptor de la asialoglicoproteína es el aumento en el contenido celular de GMPc. Este efecto sugiere que es un segundo mensajero el que genera los efectos inducidos por la biotina y corrobora los trabajos realizados por Vesely y Col (68), quienes encontraron que la biotina, en concentraciones micromolares, produce un aumento en la actividad de la guanilato ciclasa. Sin embargo, se ha demostrado que la biotina produce su efecto de inducción a dosis menores, lo que sugiere la existencia de otro mecanismo de acción. La presencia de biotina en el núcleo (69), así como la presencia de una proteína de 60 kD en el núcleo capaz de unir reversiblemente a la vitamina con una constante de disociación de aproximadamente 2.2×10^{-7} M (70), apoya la posibilidad de un segundo mecanismo de regulación génica de la biotina a dosis menores a las micromolares, a través de un receptor nuclear, quizá de manera similar al mecanismo utilizado por las vitaminas A y D (71,72).

5. Por otra parte se ha encontrado que el GMPc tiene tres posibles blancos en la célula: fosfodiesterasa activada por GMPc, canales iónicos dependientes de GMPc y la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). Esta última enzima cuando es activada por GMPc es capaz de translocarse en núcleo en donde fosforila a los factores de transcripción fos y CREB (73) está directamente relacionada con la activación de AP-1 mediante la fosforilación de fos. Lo anterior implica determinar si los promotores de los genes activados por biotina, tienen sitios AP-1 ya que podrían ser, en última instancia, los responsables de la estimulación transcripcional por biotina.

Las posibilidades mencionadas anteriormente son ejemplos en los que la biotina está involucrada directamente, pero también existen en la literatura otros ejemplos de

otras vitaminas hidrosolubles que también ejercen control de la expresión y que podemos tomar en cuenta para nuestros estudios con la biotina.

Un ejemplo de una vitamina hidrosoluble es la cobalamina. Esta regula posttranscripcionalmente a su propia apoenzima: la metionina sintetasa; además de inducir su actividad, aumenta los niveles de la proteína enzimática sin afectar los niveles de RNAm (74).

También se han realizado varios estudios, tanto en tejidos como en homogenados celulares, los cuales demostraron que otra vitamina hidrosoluble, el piridoxal fosfato, influye sobre diferentes propiedades bioquímicas de los receptores de hormonas esteroides, incluyendo su conformación molecular, carga de superficie y susceptibilidad a proteólisis exógena (75). Esto es, el piridoxal fosfato afecta la localización subcelular y la capacidad de unión a el DNA de receptores esteroides.

Por otra parte, además de todos los resultados arriba mencionados sobre las enzimas que directamente participan con la biotina, es importante mencionar un hallazgo de los efectos de la biotina sobre el metabolismo. Resulta que la excreción urinaria del ácido 3-hidroxisolaléico (3-IVA), un metabolito derivado del camino catabólico de la leucina, y que además se ha utilizado como un marcador de deficiencia de biotina (19,76), no había sido previamente estudiado en relación a:

- a) un período de tiempo durante la deficiencia de biotina
- b) la cinética de la disminución en las actividades de las carboxilasas
- c) al inicio de los síntomas de deficiencia

Es interesante observar que la actividad enzimática de la PCC (figura 1) baja más lentamente durante el transcurso de la deficiencia de biotina a diferencia de la excreción urinaria del 3-IVA que es excretado anormalmente (y acumulado) mucho más rápido que la enzima hepática. Las manifestaciones clínicas en las ratas se presentan aproximadamente en la octava semana, cuando existe cerca del 80% de deficiencia (figura 2).

En definitiva, los cambios que observamos de los niveles de RNAm de la HCS pueden ser estudiados más específicamente para corroborar en qué etapa de la transcripción está regulando la biotina, por lo cual podríamos sugerir la determinación directa de la tasa de transcripción del gen. Un método directo consiste en exponer las células en un tiempo breve (5 minutos o menos) a un precursor de RNA marcado radiactivamente, y entonces se determina la cantidad del RNA nuclear formado que se detectará por hibridización a su cDNA.

También podría determinarse la tasa de transcripción por el método de análisis de run-on (llamado también análisis de cadena naciente). En este ensayo, se aíslan núcleos de las células en estudio, permitiendo la incorporación de P^{32} del ribonucleótido trifosfato directamente a la cadena de RNA naciente en crecimiento para producir el nuevo RNA marcado.

Además se podrían estudiar los cambios en la estabilidad de los RNAm en el citoplasma utilizando, por ejemplo, la técnica de Nielsen y Shapiro (77) así como la tasa de su traducción (traducción *in vitro*, en un sistema libre de células) (76).

Por otra parte será conveniente identificar la mayor parte de la maquinaria de transcripción. Esto es posible solamente después de haber clonado y caracterizado el promotor del gen de la HCS, ubicando el sitio de inicio de la transcripción así como la localización de todos los elementos regulatorios. Esto permitirá, por un lado, realizar una serie de análisis para caracterizar las secuencias que controlan la transcripción del DNA; y por otro identificar genes que codifican para factores de transcripción por diversas técnicas (78,79).

Como se observa, hay todavía mucho por investigar. Las últimas líneas de este apartado expresan brevemente nuestras perspectivas inmediatas y/o mediatas de investigación. No obstante, despiertan nuevas interrogantes e inquietudes sobre la posibilidad de investigaciones profundas sobre los niveles y etapas de la regulación genética por vitaminas hidrosolubles. De hecho, la aplicación de nuevas tecnologías como microhilera de DNA, entre otros, en este tipo de investigación, podría ampliar la perspectiva de muchos expertos sobre la identificación de la expresión de miles de genes

simultáneamente en respuesta a una condición específica como en el caso de la deficiencia de biotina. Tal podría ser el objetivo de un nuevo proyecto de investigación.

CONCLUSIONES

1. Este trabajo aporta pruebas de que la biotina, además de su papel como cofactor de las carboxilasas, actúa como un modulador de la expresión genética en tres de las enzimas con las cuales está relacionada funcionalmente.
2. La regulación de las carboxilasas (PC, PCC), podría estar mediada postranscripcionalmente.
3. En cambio, la regulación de la HCS podría ser a nivel transcripcional. Los cambios de los RNAm de la HCS presentados aquí son la primera instancia conocida en mamíferos, de un efecto de una vitamina hidrosoluble sobre los RNAm de la enzima relacionada funcionalmente a ella
4. Este trabajo puede ser considerado como un punto de partida para probar un papel similar para otras vitaminas hidrosolubles, es decir, ofrece un marco de referencia para estudios posteriores de este género.

REFERENCIAS

1. Wolf B. Disorders of biotin metabolism, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C.R. Scriver, et al., Editors. 1995, McGraw-Hill: New York. p. 3151-3177.
2. Combs G. Biotin, in *The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health*. 1992, Academic Press, INC.: Ithaca, New York. p. 251-269.
3. Kogl F, Tonnis B. Plant growth substance XX. The bios problem. Isolation of crystalline biotin from egg yolk. *Physiol Chem* **242**: 43-73, 1936
4. Gyorgy P. The curative factor (vit H) for egg white injury, with particular reference to its presence in different foodstuffs and in yeast. *J Biol Chem* **131**: 733-744, 1939.
5. Melamed M. Avidin II. Purification and composition. *Biochem J* **89**: 591-599, 1963.
6. Friedrich W. Biochemistry and physiology of the vitamins: introduction, in *Vitamins*, W.d. Gruyter. 1988: Berlin New York. p. 3-63.
7. Friedrich W. Vitamins (Biotin). Walter de Gruyter. Berlin.1988: 753-805
8. Kogl F, Tonnis B. Plant growth substance XX. The bios problem. Isolation of crystalline biotin from egg yolk. *Physiol Chem* **242**: 43-73, 1936.
9. Du Vigeneaud, et al. On the structure of biotin. *J Am Chem Soc* **64**: 188-189, 1942.
10. Harris S and Wolf D. Synthetic biotin. *Science* **97**: 447-448, 1943.
11. Lardy H, Peanasky R. *Physiol Rev* **33**: 560-561, 1953.
12. Lane MD, Young DL, Lynen F. The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from apotranscarboxylase and (+)-biotin. *J Biol Chem* **239**: 2858-2864, 1964
13. Moss J, Lane MD. The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol* **15**: 321-398, 1971.
14. Wood H, Barden R. Biotin Enzymes. *Annu Rev Biochem* **46**: 385-413, 1977.
15. Dakshinamurti K, Chauhan J. Regulation of biotin enzymes. *Ann Rev Nutr* **8**: 211-233, 1988.
16. Jitrapakdee S, Wallace J. Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* **340**: 1-16, 1999.

17. Bianchi A, et al. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **265**: 1502-1509, 1990.
18. Rosenberg L. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, in *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, B.A. Scriver CR, Sly WS, Valle A, Editor. 1995, McGraw-Hill: New York. p. 1423-51.
19. Mock N, Mock D. Biotin deficiency in rats: disturbances of leucine metabolism are detectable early. *J Nutr* **122**: 1493-1499, 1992.
20. Chapman-Smith A, Cronan J. Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J Nutr*, **129**: 477s-481s, 1999.
21. Chapman-Smith A, Cronan J. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends Biochem Sci* **24**: 359-363, 1999.
22. Bartlett K, et al. Enzyme studies in biotin-responsive disorders. *J Inherit Metab Dis* **8**: 46-52, 1985.
23. Li S, Cronan J. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **267**: 855-863, 1992.
24. Achuta P, Mistry S. Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *J Sci Ind Res* **51**: 554-563, 1972.
25. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clinica Chimica Acta* **255**: 1-11, 1996.
26. Wilson K, et al. Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase / bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci* **93**: 9257-9261, 1996.
27. Cronan J. The E. coli operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell* **58**: 427-429, 1989.
28. León-del-Río A, et al. Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4626-4630, 1995.
29. Suzuki Y, et al. Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nature Genetics* **8**: 122-128, 1994.
30. Campeau E, Gravel RA. Expression in Escherichia coli of N- and C-terminally deleted human holocarboxylase synthetase. Influence of the N-terminus on biotinylation and identification of a minimum functional protein. *J Biol Chem* **276** (15): 12310-12316, 2001.

31. Velazquez A, et al. Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism. *Arch Med Res* 31 (2): 145-150, 2000.
32. Sweetman L, et al. Clinical and metabolic abnormalities in a boy with dietary deficiency of biotin. *Pediatrics* 68: 553-556, 1981.
33. Baumgartner ER, Suormala T. Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism. *Int J Vitam Nutr Res* 67: 377-384, 1997.
34. Aoki Y, et al. Identification and characterization of mutation in patients with holocarboxylase synthetase deficiency. *Human Genetics* 104: 143-148, 1999.
35. Thuy LP, Belmont J, Nyhan WL. Prenatal diagnosis and treatment of holocarboxylase synthetase deficiency. *Prenat Diagn* 19: 108-112, 1999.
36. Dupuis L, et al. Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Hum Molec Genet* 5: 1011-1016, 1996.
37. Swango KL, et al. Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. *Hum Genetic* 102: 571-575, 1998.
38. Rahman S, et al. Late presentation of biotinidase deficiency with acute visual loss and gait disturbance. *Dev Med Child Neurol* 39: 830-831, 1997.
39. Cronan J. Expression of the biotin biosynthetic operon of *Escherichia coli* is regulated by the rate of protein biotinylation. *J Biol Chem* 268: 10332-10336, 1988.
40. Bhullar R, Dakshinamurti K. The effects of biotin on cellular function in HeLa cells. *J Cell Physiol* 122: 425-430, 1985.
41. Kasturi R, Wakil S. Increased synthesis and accumulation of phospholipids during differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes. *J Biol Chem* 258: 3559-4832, 1983.
42. Moskowitz M, Cheng G. Stimulation of growth factor production in cultured cells by biotin. *Ann N Y Acad Sci* 447: 212-221, 1985.
43. Spence J, Koudelka A. Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 259: 6393-6396, 1984.
44. Chauhan J. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem* 266: 1035-1038, 1991.
45. McCarty M. High-dose biotin, an inducer of glucokinase expression, may synergize with chromium picolinate to enable a definitive nutritional therapy for type II diabetes. *Med Hypotheses* 52: 401-406, 1999.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

46. Spencer, Pilot. Hormonal regulation of glucokinase in primary culture of adult rats hepatocytes. *J Biol Chem* **254**: 12331-12336, 1979.
47. Dakshinamurti K, Li W. Transcriptional regulation of liver phosphoenol pyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* **132**: 127-32, 1994.
48. Collins JC, et al. Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J Biol Chem* **263**: 11280-11283, 1988.
49. Stockert R, Morell C. Second messenger modulation of the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* **265**: 1841-1846, 1990.
50. Stockert R, et al. Posttranscriptional regulation of the asialoglycoprotein receptor by cGMP. *J Biol Chem* **267**: 56-59, 1992.
51. Maeda Y, et al. Biotin deficiency decreases ornithine transcarbamylase activity and mRNA in rat liver. *J of Nutr* **126**: 61-66, 1996.
52. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* **43**: 506-520, 1969.
53. Sweetman L. Activity enzymatic determination of PC and PCC in cells cultured. Comunicación Personal, 1985.
54. Lowry OH. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
55. Desjardins P, Acetyl-CoA holocarboxylase synthesis in biotin-deficiency rat adipose tissue. *Arch Biochem Biophys* **142**: 292-298, 1971.
56. Chomczynski P, Sacchi N. single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159, 1987.
57. Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A. & Cerbón, M.A. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hipotalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett* **214**: 25-28, 1996.
58. Rodríguez-Melendez R, et al. Differential effects of biotin deficiency and replenishment on rat liver pyruvate and propionyl-CoA carboxylases and on their mRNAs. *Mol Genet Metab* **66** (1): 16-23, 1999.
59. Achuta M and Mistry. Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *J Scient Ind Res* **31**: 554-562, 1972.

60. Sundaram T, Cazzulo J, Kornberg L. Pyruvate holocarboxylase formation from the apoenzyme and d-biotin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **143**: 609-616, 1971.
61. Lodish y Col. *Molecular Cell Biology*. Fourth Edition. 2000, Freeman: England. P 1084.
62. Katunuma N, Kominami E, Kominami S. A new enzyme that specifically inactivates apo-protein of pyridoxal enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **43**: 70-75, 1971.
63. Katunuma N, Kito K, Kominami E. A new enzyme that specifically inactivates apo-protein of NAD-dependent dehydrogenases. *Biochem Biophys Res Commun* **43**: 76-81, 1971.
64. Masayoshi N, Tanaka K. FAD-dependent regulation of transcription, translation, post-translational processing, and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and of electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation. *J Biol Chem* **267**: 17925-17932, 1992.
65. Leon Del Rio A, Gravel R. Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl CoA carboxylase a subunit expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 22964-22968, 1994.
66. De la Vega L, Stockert R. The cytoplasmic coatomer protein COPI. *J Biol Chem* **274**: 31135-31138, 1999.
67. De la Vega L, Stockert R. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptor via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**: C2037-C2042, 2000.
68. Veseley D. Biotin enhances guanylate cyclase activity. *Science* **216**: 1329-1330, 1982.
69. Dakshinamurti K, Mistry SP. Tissue and intracellular distribution of biotin- C^{14} OOH in rats and chick. *J Biol Chem* **238**: 294-296.
70. Dakshinamurti K, Chalifour LE, Bhullar RP. Requirement for biotin and the function of biotin in cells in culture. *Ann N Y Acad Sci* **447**: 38-55.
71. Cabrera G, et al. Regulation of hepatic glucokinase activity and gene expression by retinoic acid. *Mol Cel Endocrinol*, 2000.
72. Lian J, et al. Regulates expression of the bone-specific osteocalcin gene by vitamin and hormones. *Vitamin Horm* **53**: 443-509, 1999

73. Gudi T, Casteel DE, Vinson C, Boss GR, Pilz RB. NO activation of *fos* promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. *Oncogene* **19**: 6324-6333, 2000.
74. Gulati S, Brody L, Banerjee R. Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B₁₂. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 436-442, 1999.
75. Tully D, Allgood V, Cidlowsky J. Modulation of steroid receptor-mediated gene expression by vitamin B6. *FASEB J* **8**: 343-349, 1994
76. Teran-García M, Ibarra I, Velázquez A. Urinary organic acids in infant malnutrition. *Pediatric Res* **44**: 386-391, 1998.
77. Nielsen DA, Shapiro DJ. Insights into hormonal control of messenger RNA stability. *Mol Endo* **4**: 953-953, 1990.
78. Kadonaga JT, Tjian R. Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 5589, 1986.
79. Yoshinaga SK, L'Etoile ND, Berk AJ. Purification and characterization of transcription factor IIIc2. *J Biol Chem* **264**: 10529, 1989.
- A. Velazquez A, Martín del Campo C, Baéz A. Biotin deficiency in protein-energy malnutrition. *Eur J Clin Nutr* **43**: 169-173, 1988.
- B. Velazquez A, Teran M, Baez A, Gutierrez J, Rodríguez R. Biotin supplementation effects on lymphocyte carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition *Am J Clin Nutr* **61**: 385-391, 1995.

APENDICE A

SOLUCIONES

- **PBS pH 7.0**

Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na_2HPO_4 y 0.24 g de KH_2PO_4 en 800 ml de H_2O destilada. Ajustar el pH a 7.0 con HCl. Aforar a 1 litro con H_2O . Esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

- **Bromuro de Etidio (10 mg/ml)**

Agregar 1 g de bromuro de etidio en 100 ml de H_2O . Agitar varias horas para asegurar la completa disolución del reactivo. Almacenar la solución en oscuridad y a temperatura ambiente.

PRECAUCIÓN: el bromuro de etidio es un agente mutagénico potente y moderadamente tóxico. Se debe manejar con guantes en todo momento.

- **Solución de Bray**

Disolver 180 g de Naftaleno, 12 g de 2-4-dimetil oxazol, 60 ml de etilenglicol y 300 ml de metanol. Se mezclan primero los líquidos y después se les añade los sólidos y posteriormente se afora a 3000 ml con dioxano.

- **Amortiguador de lisis**

Tris 50 mM, EDTA 0.025 mM. Disolver los ingredientes con 90 ml de H_2O destilada. Utilizar HCl para ajustar el pH y aforar a un volumen final de 100 ml de H_2O .

- **Amortiguador de TAE 50X**

Disolver 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Aforar a 1 litro con H_2O destilada.

- **Solución de Azul Tripano**

Preparar una solución al 0.4% en PBS

- **Amortiguador SSC 20X**

Disolver 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de H₂O. Ajustar el pH a 7 con NaOH y aforar a 1 litro. Esterilizar por autoclave. Almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente.

- **MOPS 12X**

Disolver MOPS 0.24 M y Acetato de Na 96 mM en 400 ml de H₂O DEPC. Ajustar a pH 7. Añadir 12 ml de EDTA mM. Aforar a 500 ml de H₂O DEPC. Esterilizar por filtración y guardar en oscuridad a temperatura ambiente.

- **Amortiguador de transferencia**

TRIS 48 mM

Glicina 9 mM

SDS 1.3 mM

Metanol 20%.

- **Amortiguador de bloqueo**

Ácido Bórico 100mM

Borato de sodio 47mM

NaCl 75mM

Leche en polvo 5%

- **Amortiguador de incubación de replica**

NaCl 0.9%

Tris-HCL 10mM pH 7.4

Tween 20 0.05%

- **Amortiguador de lavado**

NaCl 0.5M

Tritón X-100 0.25%

Fosfato de sodio 20mM

APENDICE B

Alineación de las secuencias de HCS humana y de *Saccharomyces*.

Se realizó una alineación entre las secuencias de aminoácidos de la HCS humana y la de *Saccharomyces*, con el programa GeneStream Align Home Page. Se metieron al programa 690 aa (Sacc) contra 726 aa (hum) resultando 24.0% de identidad con un "global alignment score" de 425. A continuación se presenta la parte de la secuencia en donde se localizaron las secuencias conservadas:

424		483
	RGRGGNTWINPKGVCASTAVWTPLOSPVTNRNISVVFQYLSMLAYCKAILSYPAGFSD	
	KGRGGNVWLSVPGCALSTLLISIPLRSQLGQR-----IPFVQHLMSSVAVVEAVRSI-PEVQD	
507		562
484	1	543
	IPVRI KWPNDLY ALSPTVYKRKNLKLVNTGFEHTKPLPLGDIEPAYLKISGLLVNTHFINN	
	INLRV KWPNDI Y -----YSDL-----MKIGGVLVNSTLMGE	
563		593
544		603
	KYCLLLGCCINLTS DGP TTS LQT WIDILNEERQQLHLDLLPAIKAERLQALVMNNLEVL	
	TFVILIGCGFNVTNSNPTICIN-----DLITEYNKQHKAELKP-LRADVLIARWVTVLEKLY	
594		649
604		663
	KQFINYGAAEILPSYVELWLHSNQIVTLPDHGNTQAMITGITEDVGLLIAKELVSGSSTQ	
	KEFQDKGPN SVL PLYVRYWVHSGQOVHLGSAEGPKVSI VGL- D D S G F L Q V H ----- Q	
650		700
664	2	691
	FTGNVYNLQ PDGNTFD IFKSLIAKKVQS	
	EGGEVTVH PDGNSFD MLRNILPK-RR	
701		726

En los rectángulos se muestran los dos fragmentos conservados que se utilizaron como base para diseñar los oligonucleótidos degenerados. Después se recurrió a la tabla de uso de codones de la rata, para que los oligonucleótidos fueran menos degenerados ([www.dna.affrc.go.jp/nakamura-bin/showcodon.cgi?species=Rattus+norvegicus+\[gbrod\]](http://www.dna.affrc.go.jp/nakamura-bin/showcodon.cgi?species=Rattus+norvegicus+[gbrod])).

Finalmente los oligonucleótidos quedaron como sigue:

5' AAG TGG CCC AAC GAV ATT TAY 3' V- C o T

5' GTC GAA GGA GTT GCC GTC CCG 3'

APENDICE C

Datos complementarios a las figuras 5 y 6

Organs	n	Activity nmol CO ₂ fixed x min ⁻¹ x mg protein ⁻¹		Protein Optic Density			Messenger RNA Expression rate (PC/Actin)		
		C	D	n	C	D	n	C	D
Liver	4	102.33 ± 15.63	5 0.50 ± 0.03	3	6.29 ± 2.26	2.06 ± 0.37	3	0.91 ± 0.02	1.04 ± 0.11
Kidney	5	59.12 ± 13.82	5 20.85 ± 4.38	3	4.10 ± 0.77	1.37 ± 0.41	3	1.05 ± 0.08	0.98 ± 0.11
Muscle	5	5.27 ± 0.52	5 2.20 ± 0.37	4	4.56 ± 1.04	0	3	2.12 ± 0.35	2.19 ± 0.25
Brain	3	27.42 ± 2.10	4 16.70 ± 1.86	3	5.54 ± 1.39	4.44 ± 1.32	3	2.16 ± 0.53	2.12 ± 0.42
PCC									
Liver	4	1.48 ± 0.27	0.50 ± 0.03	3	44.24 ± 8.50	7.68 ± 1.22	3	0.84 ± 0.05	0.69 ± 0.15
Kidney	5	2.73 ± 0.54	0.89 ± 0.13	3	3.62 ± 1.43	1.29 ± 0.02	3	0.80 ± 0.12	0.70 ± 0.05
Muscle	5	0.009 ± 0.001	0.005 ± 0.0009	3	1.96 ± 0.58	0.76 ± 0.22	3	2.16 ± 0.53	2.12 ± 0.42
Brain	4	1.06 ± 0.10	0.69 ± 0.08	3	6.48 ± 1.18	4.79 ± 1.18	3	1.81 ± 0.47	2.33 ± 0.45

APENDICE D

Artículos publicados

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Biotin Regulates the Genetic Expression of Holocarboxylase Synthetase and Mitochondrial Carboxylases in Rats¹

Rocío Rodríguez-Meléndez, Saúl Cano, Sara Teresa Méndez and Antonio Velázquez²

Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and Instituto Nacional de Pediatría, México DF 04530

ABSTRACT Biotin is the cofactor of carboxylases (pyruvate (PC), propionyl-CoA (PCC), 3-methyl crotonyl-CoA and acetyl-CoA), to which it is covalently bound by the action of holocarboxylase synthetase (HCS). We have studied whether biotin also regulates their expression, as it does other, nonrelated enzymes (e.g., glucokinase, phosphoenol pyruvate carboxykinase, guanylate cyclase). For this purpose, HCS, PC and PCC mRNAs were studied in biotin-deficient rat liver, kidney, muscle and brain of biotin-deficient rats. PC- and PCC-specific activities and protein masses were also measured. The 24-h time course of HCS mRNA in deficient rats was examined after biotin supplementation. HCS mRNA was significantly reduced during vitamin deficiency. It increased in deficient rats after biotin was injected, reaching control levels 24 h after administration. These changes seem to be the first known instance in mammals of an effect of a water-soluble vitamin on a mRNA functionally related to it. In contrast, the decreased activities of the carboxylases were associated with reductions in the amounts of their enzyme proteins except in brain. However, their mRNA levels were not affected. There are no reports on these types of vitamin affecting the mRNA or protein levels of their apoenzymes or their products. This work provides evidence for biotin being a modulator of the genetic expression of the enzymes involved in its function as a cofactor. As such, it may be a useful model for probing a similar role for other water-soluble vitamins. *J. Nutr.* 131: 1909-1913, 2001.

KEY WORDS: • biotin • carboxylases • holocarboxylase synthetase • gene expression • rats

Besides their well-known roles as substrates and cofactors, nutrients have recently been found to function as regulators of gene expression (1). Among them are polyunsaturated fatty acids (2), cholesterol (3,4), glucose and fructose (5), specific minerals such as iron (6) and lipid-soluble vitamins like retinoic acid (7,8). As such, they act at different levels, including nuclear proteins and cis-acting elements (9,10). In contrast, little is known about water-soluble vitamins as genetic modulators (11,12). In particular, we are not aware of any report of these vitamins regulating their coenzyme role through the mRNA of the enzyme responsible for the holoenzyme formation.

Biotin is the cofactor of the carboxylases of pyruvate (PC),³ propionyl CoA (PCC), 3-methyl crotonyl CoA (MCC) and acetyl CoA, the first three located in the mitochondria and the last in the cytosol. These enzymes participate in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, catalyzing the carboxylation of different metabolites (13-15). They are synthesized as inactive apocarboxylases. Holocarboxylase synthetase (HCS) catalyzes their activation by covalently binding

biotin to a lysine residue (16). In this article we present evidence that biotin regulates the genetic expression of the enzymes to which it is functionally related, at the mRNA level in the case of HCS and at the protein levels of carboxylases (PC and PCC). The effects of biotin deficiency were studied in rat liver, kidney, muscle and brain.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and chemicals. [α -³²P] deoxycytidine triphosphate [dCTP (30 Ci/mmol)], sodium [¹⁴C] bicarbonate (58.0 mCi/mmol) and Megaprime DNA labeling system were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). TRIzol reagent, oligo (dt) cellulose columns, M-MuLV reverse transcriptase (40,000 U) kit and 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate were purchased from Life Technologies (Gaithersburg, MD). Amplifase (5 U/ μ L) was purchased from Biotechnology Universitarias (México City, México). Gene-scan II kit was purchased from BIO 101. ATP, d-biotin, acetyl-CoA, propionyl-CoA, glutathione and pyruvic acid were purchased from Sigma Chemicals (México City, México). Nitroblue tetrazolium chloride, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt, streptavidin-alkaline phosphatase conjugate and biotinylated sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis high range standards were purchased from Bio-Rad (México City, México). Complete protease inhibitors were purchased from Roche Molecular Biochemicals (México City, México).

Animals and biotin-deficient diet. Male Wistar rats, ages 21 to 28 d (40-60 g), obtained from the Experimental Research Department at the National Institute of Pediatrics, México DF were placed in air-filtered cages and were fed a biotin-deficient diet (17) (ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH). Environmental condi-

¹Supported by Research Grant 27973-M from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

²To whom correspondence should be addressed.

E-mail: velazq@esandor.unam.mx

³Abbreviations used: dCTP, deoxycytidine triphosphate; HCS, holocarboxylase synthetase; MCC, 3-methyl crotonyl CoA; PBS, phosphate buffer saline; PC, pyruvate carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; SDS, sodium dodecyl sulfate.

tions and light-dark cycles (12:12 h) were strictly controlled. For each of the deficient rats, two rats were injected with 200 µg of biotin in 1.0 mL of phosphate buffer saline (PBS [pH = 7.0]) intraperitoneally. Rats were killed by intraperitoneal injection of 200 µL sodium pentobarbital (Pflizer, Mexico City, Mexico), at wk 8–10 of the experimental period, when manifestations of deficiency began to appear (see Results). Liver, kidney, abdominal muscle and brain were removed and frozen at -70°C . The protocols used in these experiments were approved by the Animal Care Committee of the National Institute of Pediatrics, Mexico DF.

Tissue homogenates. The organs were thawed, washed with PBS and homogenized with a polytron (Kinematica AG, Littau, Switzerland), at 4°C , for two pulses of 10 s each, with a 30-s pause between them, in three volumes of the homogenate buffer, pH 7.5 (0.5 mol/L Tris HCl, 1 mol/L KCl, 10 mmol/L EDTA) containing the protease inhibitors mix. The homogenates were then sonicated (Branson cell disruptor 200, Danbury, CT) with five sonication pulses of 10 s each, with 1-min pauses between them, followed by centrifugation at $105,000 \times g$ at 2°C for 10 min. The fat layer was discarded, and samples were obtained for protein determination by the Lowry method and for storage at -70°C .

Rat HCS cDNA cloning. A segment of HCS cDNA was cloned from normal rat liver poly A RNA, using as primers oligonucleotides whose sequence was conserved among different distant species. For this purpose, degenerate oligonucleotides were designed aligning HCS yeast, mouse and human sequences to find conserved regions. The Coker Usage Table (CUT; <http://www.dnainfo.com/infokanukamin/showedown.cgi>) sequences [Rattus + norvegicus + [gbrown]] was used to obtain the least degenerate sequence to be used as primers: Sense 5'-AAG TGG CCC AAC GAYC(T) ATT TAY 3'; antisense 5'-GTC GAA GGA GTT GCG GTC CGG 3'. Reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR) (18) (GeneAmp PCR system; Perkin Elmer, Norwalk, CT) were used to achieve a rat cDNA fragment of HCS, using the oligonucleotides above mentioned. The reaction mix for RT contained total RNA 2 µg/2.5 µL, 5× buffer, dithiothreitol 4 mmol/L, dATP, dCTP, dTTP, dTTP, dTTP and M-MLV reverse transcriptase 40 U, in 10 µL final volume. The reaction mix for PCR contained the primers 0.5 mmol/L each, buffer 10×, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dATP, dCTP, dTTP, dTTP, dTTP and deoxyguanosine triphosphate 200 µmol/L each, Taq polymerase 4 U in a final volume of 50 µL. The RT-PCR products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel and purified with GeneClean II kit. Once the rat HCS cDNA fragment was obtained, it was sequenced (Fig. 1), and two oligonucleotides were designed from the terminal regions of this fragment. The final sequences of the specific primers were: Sense 5'-TAC AGC CTC TAT GAA GAT CG 3'; Antisense 5'-CTC CAC ACC CCA CCA CC 3'; and subsequently used for Southern blot analysis.

```

5' TACAGCCTCTATG AAGATGCGGGGTTGCTTGGTAAATTCACACTTGT
T G O M L E I D R F G I
GGAGAAACATTTATATCTGTTTCCGCTGTGCTGATCAATGTACTAC
G E F T F I L I G C G V N Y V I
AGCATCTCTACATATATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
S N P T T C I N D L I E S H N K
CGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
G N K A R A D C F L I
AAGGCTTACGCTTCTGAGAACTGATTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
R A V A
AGGCTTACGCTTCTGAGAACTGATTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
G D G R G F W H I
GGGCTTACGCTTCTGAGAACTGATTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
G O V D G G S E G P V S I
GGGCTTACGCTTCTGAGAACTGATTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
V O L D D G F L Q V H Q E G G
GGGCTTACGCTTCTGAGAACTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
G O G O M N

```

FIGURE 1 Nucleotide and derived amino acid sequence from a rat HCS cDNA fragment. A segment of HCS cDNA was cloned from normal rat liver poly A RNA, using as primers oligonucleotides whose sequence was conserved among different distant species. This fragment corresponds to the human HCS sequences between region between amino acid 570 and 717. The sequences of the specific primers utilized for semiquantitative determination of HCS mRNA, by RT-PCR analysis, are shown in bold type.

Semiquantitative analysis of HCS mRNA. Total RNA was obtained from the different organs of 11 deficient and five deficient rats. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (19). Its concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 mol/L formaldehyde. Total RNA (4 µg) was reverse transcribed to synthesize single-strand cDNA. The RT reaction mixture was subjected to PCR to amplify the HCS cDNA fragment, as described above. The other 10 µL of the cDNA was used to amplify simultaneously a fragment of the rat actin gene, which was used as a constitutive expression control (sense 5'-GGG TCA GAA GCG TTC CTA TG 3'; antisense 5'-GGT CTC AAC CAT GAT CAT CTG GG 3'). The 50 µL PCR included 10 µL of previously synthesized cDNA, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 200 µmol/L of each d-deoxynucleoside 5'-triphosphate, 0.5 µmol/L of each primer and 2.5 U of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with nonretrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, the PCR was performed 30 cycles for HCS. The cycle profile for HCS and actin gene amplification was 95°C , 1 min; 72°C , 1 min; and a final extension was performed at 72°C , 5 min. The number of cycles performed was within the exponential phase of the amplification process previously determined. PCR products were separated on 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and subjected to Southern blot analysis. The gels were transferred to GeneScreen membranes and hybridized with radiolabeled probe. Probes (for HCS and actin) were radiolabeled with ^32P -dCTP (30 µCi) and hybridized with the probes. The membranes were washed twice with 2× SSC (sodium chloride/sodium citrate) at room temperature for 15 min. The membranes were exposed to Hyperfilm BMax films for 24 h at -70°C . The closely approximated levels of HCS mRNA were estimated from the intensity of the bands in the autoradiographs, quantified by densitometry (see below). The data were normalized with the estimated mRNA actin levels, similarly obtained. Statistical analysis was performed using Student's *t* test.

Time-course effect of biotin on HCS mRNA. Six deficient biotin rats were injected intraperitoneally with 200 µg of biotin in 1.0 mL of PBS (pH 7.0) and killed at different times: 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 24 h. Each liver was obtained, stored at -70°C and processed separately. RNA total was extracted using TRIzol reagent. RT-PCR analysis was made as described above.

Carboxylase assays. The homogenates were thawed, resuspended in 200 µL of lysis buffer and sonicated twice on ice (10 s each) with a 20-s pause between each sonication. They were then centrifuged at $750 \times g$ at 2°C for 10 min, and the supernatant was used. PCC and PC activities were determined using the assays by Barry et al. (20) and the enzyme activities were expressed as nmol CO₂ fixed $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg protein}^{-1}$.

Carboxylase mass determination. The mass of the carboxylase was estimated by streptavidin blots after *in vitro* biotinylation of tissue homogenates, to convert apo to holo-carboxylases. Homogenate apocarboxylases were biotinylated by a technique modified from Desjardins and Dakshinamurti (21). Aliquots of the homogenates containing 500 µg protein were added to the reaction mix containing 60 nmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.82 mmol/L biotin, 0.1 mmol/L EDTA, bovine serum albumin 0.60 µg/L, 3 mmol/L reduced glutathione, 8 mmol/L MgCl₂ and 10 mmol/L ATP) in a final volume of 500 µL. It was incubated at 37°C for 6 h; additional ATP-MgCl₂ mix (26.75 µL) was added at the h 2 and 4 of incubation (22). The reaction was stopped by the addition of 500 µL of electrophoresis buffer [0.5 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 40% glycerol, 10% SDS and 0.5% bromophenol blue] and stored at -70°C . Maximal homogeneity in biotinylation was obtained by optimizing the reagents concentrations and the incubation time. Nonbiotinylated controls were similarly incubated, except that no biotin and ATP were added to the reaction mix. After centrifuging 5 µg of homogenate protein were added to a SDS 8% polyacrylamide gel and electrophoresed (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) at 70 mA for 1 h. The gel was incubated with transfer buffer (48 mmol/L Tris, 39 mmol/L glycine, 1.3 mmol/L SDS, 20% methanol) with slow agitation for 30 min and blotted on a nitrocellulose membrane, 0.45 µm (Bio-Rad, Hercules, CA), using a semidry transfer cell (Bio-Rad), at 17 V for 30 min. The membrane

was incubated with streptavidin-alkaline phosphatase to detect biotinylated proteins (23). It was soaked in 50 mL of 5% biotin buffer (100 mmol/L boric acid, 47 mmol/L sodium borate, 75 mmol/L NaCl, 50 μ L powder milk) at 4°C with slow agitation for 1 h, and washed with 80 mL of replicate buffer [90 μ L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 0.50% Tween 20]. It was then incubated in 50 mL of wash buffer (0.15 mol/L NaCl, 0.25% Triton X 100, 20 mmol/L Na₂HPO₄) containing 10 μ L streptavidin-alkaline phosphatase, at room temperature for 2 h. Afterward, it was washed three times with replicate buffer for 5 min each time and with 0.15 mol/L Tris-HCl (pH 8.8). Color development was performed incubating the membrane in the dark, with slow agitation, in 100 mL A-P buffer [10 mmol/L Tris base (pH 9.5), 10 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, containing 50 μ L nitroblue tetrazolium chloride solution (nitro blue tetrazolium 0.3 g in 1 mL 70% N,N-dimethylformamide) and 50 μ L 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt solution (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 0.15 g in 1 mL 70% dimethylformamide)]. Once the bands became visible, the membrane was washed with double-distilled water. Under these electrophoretic conditions, there was no clear separation of PCC and MCC.

Semiquantitative analysis of PC and PCC mRNA. The mRNA levels of PC and PCC were determined by coamplification with RT-PCR method, with the following modifications. The amplification primers for PC were sense 5'-ACT TGT ATG ACC GGG ACT GC 3', antisense 5'-TGA CCT TGA CGG GGA TTG GA 3' (13) and for PCC were sense 5'-GA TCC CCG CTC GGT TCA TGT 3', antisense 5'-GAG GCC TTG ATC ATC ACA GG 3' (24). The cycle profile was also similar to HCS and actin gene amplification, except 60°C, 1 min for annealing. Everything else was the same, including the determination of the number of cycles under which the amplification was exponential.

Densitometric analysis. The electrophoretic bands obtained for Northern and streptavidin blot analyses were digitalized using a Scan Jet 3C (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) and Deskscan software (Hewlett-Packard), and the intensity of the bands was estimated by Collage software (Hewlett-Packard).

RESULTS

Determination of biotin nutritional status. The rats fed the biotin-deficient diet, but not the controls, exhibited clear deficiency signs after wk 8 of treatment, including low body weight, hair loss, conjunctivitis and periorificial skin rash. The carboxylase activities were reduced (see below) and there was an abnormally high urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid (data not shown), a marker of biotin deficiency (25,26).

Holocarboxylase synthetase mRNA levels in biotin deficiency. HCS mRNA levels were significantly lower in the four organs of the biotin-deficient rats than in controls (Table 1). These differences were more marked in liver and kidney than in muscle and brain (Fig. 2); the mRNA in these organs of deficient rats being less than one-half that of controls.

TABLE 1

Effect of biotin deficiency on rat holocarboxylase synthetase mRNA levels in various organs¹

Organs	Control		Biotin-deficient		% of control
	n		n		
Liver	5	7.24 \pm 1.78	5	3.06 \pm 1.84*	40.0
Kidney	4	2.40 \pm 1.01	4	0.55 \pm 0.21*	23.0
Muscle	3	17.78 \pm 1.34	4	12.83 \pm 0.92*	72.2
Brain	4	3.14 \pm 0.22	4	1.70 \pm 0.26*	54.1

¹ Values are means \pm SD.

* Different from control, $P < 0.05$.

LIVER KIDNEY MUSCLE BRAIN
C D C D C D C D

HCS

ACTIN

FIGURE 2 RT-PCR analysis of HCS mRNA levels from liver, kidney, muscle and brain of control and biotin-deficient rats. RNA was reverse-transcribed and amplified by PCR using specific primers for rat HCS and actin, like constitutive control. PCR products were separated on 2% agarose gel and subjected to Southern blot analysis. C, control; D, biotin-deficient.

When biotin was injected into deficient rats, the HCS mRNA liver increased to near normal levels. However, this was a delayed effect, apparent at 24 h after administration but not during the first few hours (Fig. 3).

Effects of biotin deficiency on mitochondrial carboxylases. Pyruvate and propionyl CoA carboxylase activities were significantly reduced in the organs of the deficient rats (Figs. 4 and 5). These differences generally were associated with significantly lower amounts of their enzyme proteins. In brain, the PC and PCC mass did not differ between groups, and their decrements in activity were fairly moderate. PC and PCC mRNA levels did not differ between groups in any organ studied.

DISCUSSION

Besides its role as a cofactor of carboxylases, biotin affects the amount of these enzymes and of the holocarboxylase synthetase mRNA, whose product catalyzes their activation. This latter effect may be at the level of transcription or of mRNA processing and/or stability. The effect on the carboxylases seems, however, to be at or after translation. A prelimi-

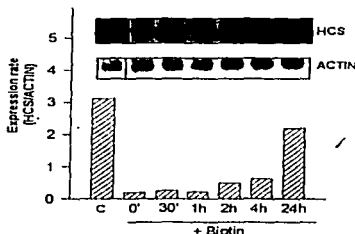


FIGURE 3 Time-course effect of biotin on HCS mRNA levels in liver from biotin-deficient rats. Six biotin-deficient rats were injected with biotin (200 μ g) and each killed at a different time: 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h and 24 h. The livers were processed as mentioned in Figure 1. C, control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

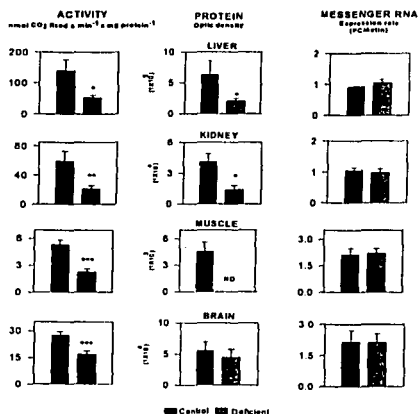


FIGURE 4. Effects of biotin deficiency on activity, carboxylase mass and mRNA levels of the PC in organs of male Wistar rats fed a biotin-deficient diet or control and killed by intraperitoneal injection of 200 μ l of sodium pentobarbital. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$ vs. control. ND, not detected.

nary account of the effects of biotin deficiency on rat liver and cultured hepatocyte carboxylases was recently published (26). A joint increase of HCS and of carboxylase activities was observed when 3T3-L1 mouse fibroblasts differentiated to adipocytes (27), suggesting the existence of coordinated controls of the expression of these functionally related enzymes.

Regulation of genetic expression by vitamins has been more comprehensively studied for the lipid (8,28,29) than for the water-soluble vitamins (11,12,30,31). The HCS mRNA changes reported here seem to be the first known instance in mammals of an effect of a water-soluble vitamin on the mRNA of an enzyme that acts directly with that vitamin. The observed changes were quite evident, reproducible and significant. In contrast, the apparent variation in the HCS mRNA amounts among organs likely lacks biological importance, because the densitometric conditions used to observe the bands varied from organ to organ. Information on possible differences in the amount or activity of its protein product is not currently available.

Small molecules may have a direct effect on mRNA levels, e.g., by interacting with transcription factors or with RNA-binding proteins (32). Biotin has been shown to be present in the cell nucleus together with a 60-kDa biotin-binding protein, to which this vitamin binds reversibly in vitro (33), suggesting the possibility of gene regulation through a nuclear receptor, as with vitamins A and D (8,34). However, the long lapse between biotin administration to deficient rats and the recovery of the HCS mRNA levels suggests a more indirect action, requiring metabolic processing, e.g., protein synthesis, or affecting endocrine or signaling pathways. In this respect, it is interesting that increased levels of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate,

mediated by guanylate cyclase (35), were associated with biotin-induced expression of hepatic glucokinase (36,37) and the asialoglycoprotein receptor (38). These results suggest that second messenger (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) may be involved in the effects evoked by biotin. Additional studies are needed to clarify the mechanism(s) involved in the HCS mRNA changes reported herein.

Along with the decrease of HCS mRNA, not only the activity, but also the actual amounts (mass) of carboxylases (PC and PCC) were reduced in the biotin-deficient rats, although their mRNA levels were unaffected. ApoPC and apoPCC, devoid of their cofactor, might be more prone to degradation than their holo forms (39). Alternatively, biotin deficiency may reduce the synthesis of PCC and PC (40).

It is interesting that PC was unaffected in the brain of the biotin-deficient rats. It may be that relatively normal concentrations of biotin are maintained locally, because a similar result was observed for brain PCC, with a lesser reduction of the carboxylase activities, relative to other organs. This is supported by the observation that brain holoPC and holoPCC concentrations (measured in streptavidin blots of homogenates incubated without biotin and ATP, results not shown) were sustained in the deficient rats. It will be important to identify those steps in the metabolism of biotin in the brain, e.g., its transport across the blood-brain barrier (41), which may contribute to spare this organ during vitamin deficiency.

In conclusion, this work provides evidence for biotin as a modulator of the genetic expression of the enzymes involved in its function as a cofactor. As such, it may be a useful model for probing a similar role for other water-soluble vitamins.

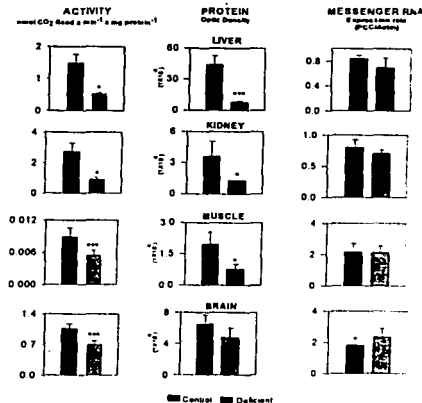


FIGURE 5. Effects of biotin deficiency on activity, carboxylase mass and mRNA levels of the PCC in organs of male Wistar rats fed a biotin-deficient diet or control and killed by intraperitoneal injection of 200 μ l of sodium pentobarbital. Protein (middle panel) includes MCC because it comigrates with PCC. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.005$ vs. control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ACKNOWLEDGMENTS

We thank students Daniel Ortega, Merlin Toledo, Gabriela Sandovall and Victor Serrano. We also thank Alfonso León Del Río and Ignacio Camacho Arroyo for their helpful advice and continued support. Finally, Margarita Terán, Silvestre Fréuk and Stephen Cerdehuan carefully read the manuscript and contributed many useful comments and suggestions.

LITERATURE CITED

- Hanson, R. W. (2000) Nutrient control of gene transcription *mini-review series*. *J. Biol. Chem.* 275: 30747.
- Duplue, E., Glorian, M. & Forest, C. (2000) Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275: 30740-30752.
- Dawson, P. A., Metherell, J. E., Ridgway, N. D., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1991) Genetic distinction between sterol-mediated transcriptional and posttranscriptional control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 266: 9128-9134.
- Osborne, T. F. (2000) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* 275: 32379-32382.
- Vaslont, S., Vasseur-Cognet, M. & Kahn, A. (2000) Glucose regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275: 31555-31558.
- Klausner, R. D. & Harford, J. B. (1989) *Cis-trans* models for post-transcriptional gene regulation. *Science* 246: 870-872.
- Fernández-Mejía, C. & Davidson, M. B. (1992) Regulation of glucokinase and proinsulin gene expression and insulin secretion in RIN-m3F cells by desamethylnore, retinoic acid, and thyroid hormone. *Endocrinology* 130: 1660-1668.
- Nagpal, S. & Chandraratna, N. A. (1998) Vitamin A and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 1: 341-346.
- Clarke, S. D. (1997) Nutrient regulation of gene expression: a methylogical strategy. *Miner. Electrolyte Metab.* 23: 130-134.
- Clarke, S. D. & Abraham, S. (1992) Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events. *FASEB J.* 6: 3148-3152.
- Nagao, M. & Tanaka, K. (1992) FAD-dependent regulation of transcription, translation, post-translational processing, and post-processing stability of various mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and of electron transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation. *J. Biol. Chem.* 267: 17925-17932.
- Gutali, S., Brody, L. C. & Banerjee, R. (1999) Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259: 436-442.
- Jitrapakdee, S., Booker, G. W., Cassidy, A. I. & Wallace, J. C. (1997) The rat pyruvate carboxylase gene structure: alternate promoters generate multiple transcripts with the 5'-end heterogeneity. *J. Biol. Chem.* 272: 20522-20530.
- Moss, J. & Lane, M. D. (1971) The biotin-dependent enzymes. *Adv. Enzymol.* 35: 321-398.
- Wolf, B. (1995) Disorders of biotin metabolism. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., eds.), pp. 3151-3177. McGraw-Hill, New York, NY.
- León-del-Río, A., LeClerc, D., Ackeman, B., Wakamatsu, N. & Gravel, R. A. (1995) Isolation of a cDNA encoding human holoacetyl-CoA synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4626-4630.
- Maeda, Y., Kawata, S., Inui, Y., Fukuda, K., Igura, T. & Matsuzawa, Y. (1996) Biotin deficiency decreases ornithine transcarbamylase activity and mRNA in rat liver. *J. Nutr.* 126: 61-66.
- Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A. & Cerdán, M. A. (1996) Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214: 25-28.
- Chromczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Bury, B. J., Sweetman, L. & Nyhan, W. L. (1985) Heterogeneity of holoacetyl-CoA synthetase in patients with biotin responsive multiple carboxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 326-337.
- Desjardins, P. R. & Dakshinamurti, K. (1971) Acetyl-CoA holoacetyl-CoA synthetase in biotin-deficiency rat adipose tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 142: 292-298.
- Kosow, D. P. & Lane, M. D. (1961) Propionyl apocarboxylase activation catalyzed by cell-free enzyme extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5: 191-195.
- Prahl, A. C., Brubaker, K. O., Leach, R. M. & Gay, C. V. (1998) Detection of endogenous biotin-containing proteins in bone and cartilage cells with streptavidin probes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 312-314.
- Browner, M. F., Taroni, F., Szilá, E. & Rosenberg, L. E. (1989) Sequence analysis, biosynthesis, and mitochondrial import of the α -subunit of rat liver propionyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 264: 12680-12685.
- Mock, N. I., Malik, M. I., Stumbo, P. J., Bishop, W. P. & Mock, D. M. (1997) Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 951-958.
- Rodríguez-Meléndez, R., Pérez-Andrade, M. E., Díaz, A., Deolarte, A., Camacho-Arroyo, I., Cacerón, I., Barria, I. & Velázquez A. (1999) Differential effects of biotin deficiency and replenishment on rat liver pyruvate and propionyl-CoA carboxylases and on their mRNAs. *Mol. Genet. Metab.* 66: 18-23.
- Chang, H. I. & Cohen, N. D. (1983) Regulation and intracellular localization of the biotin holoacetyl-CoA synthetase of 3T3-L1 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 237-247.
- Azzi, A., Boscobonik, D., Clement, S., Ozer, N., Rucciacelli, R. & Stocker, A. (1999) Vitamin E mediated response of smooth muscle cell to oxidant stress. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45: 191-198.
- Chu, F. F., Esowry, R. S., Lee, L. & Wilczynski, S. (1999) Retinoic acid induces Gp126 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Nutr.* 129: 1846-1854.
- Adigod, V. E. & Cickowski, J. A. (1992) Vitamin B6 modulates transcriptional activation by multiple members of the steroid hormone superfamily. *J. Biol. Chem.* 266: 3819-3824.
- Aligood, V. E., Powell-Oliver, F. E. & Cickowski, J. A. (1990) Vitamin B6 influences glucocorticoid receptor-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 265: 12424-12433.
- Heakht, J. E., Vasconcelos, M. H. & Bermano, G. (1998) Regulatory signals in messenger RNA, determinants of nutrient-gene interaction and metabolic compartmentation. *Br. J. Nutr.* 80: 307-321.
- Dakshinamurti, K. C. (1994) Biotin-binding proteins. In: *Vitamin Receptors* (Dakshinamurti, K. C., ed.), pp. 200-249. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Carberg, C. (1993) Lipid soluble vitamins in gene regulation. *BioFactors* 10: 91-97.
- Singh, I. & Dakshinamurti, K. (1988) Stimulation of guanylate cyclase and RNA polymerase II activities in HeLa cells and fibroblasts by biotin. *Mol. Cell. Biochem.* 79: 47-55.
- Chauhan, J. & Dakshinamurti, K. (1991) Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J. Biol. Chem.* 266: 10335-10338.
- Rivero-Narvaro, G., Cabrera-Valladares, G., German, M. S., Matschinsky, F. M., Velázquez, A., Wang, J. & Fernández-Mejía, C. (1999) Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology* 140: 4595-4600.
- Collins, J. C., Paetta, E., Cronin, R., Harezi, A. G. & Stockert, R. J. (1988) Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *J. Biol. Chem.* 263: 11280-11283.
- Schmick, R. T., Sweeney, E. W. & Berlin, C. M. (1965) The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyruvate. *J. Biol. Chem.* 240: 322-331.
- Jitrapakdee, S. & Wallace, J. (1999) Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256: 1-11.
- Baur, B. & Baumgartner, E. R. (2000) Biotin and biocytin uptake into cultured primary calf brain microvessel endothelial cells of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 856: 348-355.



Importancia del metabolismo de la biotina

Rocío Rodríguez Meléndez*

* Unidad de Genética de la Nutrición, Departamento de Medicina, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.

Importance of biotin metabolism

ABSTRACT

Biotin is a water soluble enzyme cofactor that belongs to the vitamin B complex. In humans, biotin is involved in important metabolic pathways such as gluconeogenesis, fatty acid synthesis, and amino acid catabolism by acting as prosthetic group for pyruvate carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, β -methylcrotonyl-CoA carboxylase, and acetyl-CoA carboxylase. Carboxylases are synthesized as apocarboxylases without biotin and the active form is produced by their covalent binding of biotin to the ϵ -amino group of a lysine residue of the apocarboxylases. This reaction is catalyzed by the holocarboxylase synthetase. The last step in the degradation of carboxylases, the cleavage of the biotinyl moiety from the ϵ -amino group lysine residues, is catalyzed by biotinidase and results in the release of free biotin, which can be recycled. Biotin regulates the catabolic enzyme propionyl-CoA carboxylase at the post-transcriptional level whereas the holocarboxylase synthetase is regulated at the transcriptional level. Aside from its role in the regulation of gene expression of carboxylases, biotin has been implicated in the induction of the receptor for the asialoglycoprotein, glycolytic enzymes and of egg yolk biotin binding proteins. Biotin deficiency in humans is extremely rare and is generally associated with prolonged parenteral nutrition, the consumption of large quantities of avidin, usually in the form of raw eggs, severe malnutrition and, inherited metabolic disorders. In animals, there are autosomal recessive disorders of biotin metabolism that result from the disruption of the activity of biotinidase or holocarboxylase synthetase.

Key words. Biotin. Carboxylases. Biotinidase. Holocarboxilase. Synthetase.

INTRODUCCIÓN

La biotina pertenece al grupo de las vitaminas hidrosolubles del complejo B. En mamíferos actúa como cofactor de cuatro carboxilasas: piruvato carboxilasa (PC), propionil-CoA carboxilasa (PCC), β -metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC), y acetil-CoA carboxilasa

RESUMEN

La biotina pertenece al grupo de las vitaminas hidrosolubles del complejo B. En humanos la biotina está directamente involucrada en importantes procesos metabólicos como la gluconeogénesis, la síntesis de ácidos grasos y el catabolismo de algunos aminoácidos, debido a su papel como grupo prostético de las enzimas piruvato carboxilasa, propionil-CoA carboxilasa, β -metilcrotonil-CoA carboxilasa y de la acetil-CoA carboxilasa. La biotina se une al sitio activo de estas enzimas y funciona como acreedor de CO_2 . Las carboxilasas se sintetizan como apocarboxilasas, carentes de biotina y la forma activa se produce por la unión covalente de la biotina al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina de la apocarboxilasa, reacción catalizada por la holocarboxilasa sintetasa. El paso final de la degradación de las carboxilasas es el rompimiento de la fracción biotinil del grupo ϵ -amino de la lisina que es catalizada por la biotinidasa y resulta en la liberación de la biotina libre, la cual puede ser nuevamente reciclada. La biotina regula, a nivel postranscripcional, la expresión de la propionil-CoA carboxilasa y, a nivel transcripcional, a la de la holocarboxilasa sintetasa. Además de su papel como cofactor y regulador de la biosíntesis de las carboxilasas, la biotina está involucrada en otras áreas del metabolismo, donde regula la síntesis de proteínas específicas entre las que se encuentran el receptor de la asialoglicoproteína, varias enzimas reguladoras del metabolismo de glucosa y proteínas que unen biotina en la yema de huevo, entre otras. La deficiencia de biotina se ha reportado en pacientes sometidos a una alimentación parenteral total, en personas que ingieren grandes cantidades de clara de huevo crudo, en niños con desnutrición energético proteínica severa y en personas con errores innatos del metabolismo. Entre estas últimas se encuentran las enfermedades autosómicas recesivas del metabolismo de biotina que resultan de la alteración de la actividad de la holocarboxilasa sintetasa o de la biotinidasa.

Palabras clave: Biotina. Carboxilasa. Biotinidasa. Holocarboxilasa. Sintetasa.

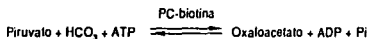
(ACC). Las tres primeras son enzimas mitocondriales y la última es una enzima citosólica. Las reacciones de carboxilación tienen una participación muy importante en el metabolismo intermediario, ya que actúan en reacciones clave de la síntesis y elongación de los ácidos grasos, anaplerosis del ciclo de Krebs, gluconeogénesis y catabolismo de proteínas y lípidos.^{1,2}

A pesar de este papel tan importante, la biotina ha recibido considerablemente menos atención de los nutricionistas en comparación con otras vitaminas, por lo cual en la presente revisión se considerarán su metabolismo, su función como cofactor de carboxilasas, como regulador de la expresión génica de carboxilasas y de diversas enzimas, así como su importancia médica y nutricional.

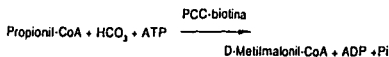
CARBOXILASAS DEPENDIENTES DE BIOTINA

El papel de la biotina en las reacciones catalizadas por las carboxilasas es fundamental, ya que actúa como un vector para transferir un grupo carboxilo activado, de una molécula donadora a una aceptora, durante la reacción de carboxilación.

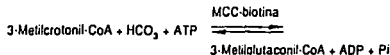
La PC es una enzima clave de la gluconeogénesis en hígado y riñón, donde cataliza el primer paso de esta vía metabólica. Está presente también en tejidos lipogénicos en los que actúa en la síntesis de ácidos grasos, en el transporte de grupos acetilo vía citrato y de equivalentes reducidos vía malato, de la mitocondria al citosol. En todos los tejidos, pero particularmente en el cerebro, tiene un papel anaplerótico en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, al catalizar la formación de oxaloacetato.^{3,4}



La PCC cataliza la conversión de propionil-CoA a metilmalonil-CoA, en la vía catabólica de los ácidos grasos de cadena impar, de los aminoácidos isoleucina, treonina, metionina y valina y del colesterol. En esta forma estos compuestos ingresan al ciclo de los ácidos tricarbóxicos vía succinil-CoA.⁵

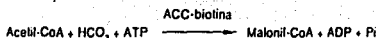


La MCC participa en el catabolismo del aminoácido leucina, convirtiendo 3-metilcrotonil CoA a 3-metilglutaconil CoA.⁶



La ACC cataliza la carboxilación de acetil-CoA, que lleva a la formación de malonil-CoA, precursor en la síntesis y elongación de los ácidos grasos y tie-

ne un papel regulador en la lipogénesis y en la β -oxidación, además interviene en la génesis de la membrana celular.⁷

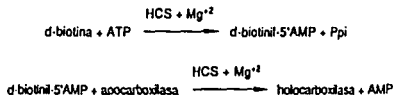


CICLO DE LA BIOTINA

En el curso de la evolución, los eucariotes perdieron la capacidad de sintetizar biotina y ahora dependen enteramente de la dieta como única fuente de esta vitamina. Sin embargo, la biotina está presente en muy bajas concentraciones en la naturaleza y esto pone en riesgo la homeostasis metabólica de la célula. Para cumplir con este requerimiento, los mamíferos han desarrollado un ciclo eficiente de la biotina para asegurar un suplemento y utilización adecuados de ésta (Figura 1).

Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas, que carecen de actividad enzimática. Cada enzima es activa sólo cuando se encuentra unida covalentemente a la biotina y entonces es llamada holocarboxilasa. La biotina se une a un grupo α -amino de un residuo de lisina de la carboxilasa en su sitio activo. Este proceso llamado biotinilación requiere de una enzima que catalice la reacción de unión de la biotina a la apocarboxilasa. Esta es la holocarboxilasa sintetasa (HCS).^{8,9}

El mecanismo de reacción de la biotinilación es el siguiente:



La biotinilación de las apocarboxilasas requiere la activación de biotina por ATP, lo cual resulta en la formación de un intermediario biotinil-adenilato. El grupo biotinilo es transferido a la apoenzima para formar la carboxilasa activa. Estas dos reacciones parciales son catalizadas por la misma enzima, HCS.¹⁰⁻¹²

La clonación del gen que codifica para la proteína HCS de humano⁸⁻¹³ tiene una función similar a la proteína BirA. Actúa como ligasa de biotina y repressor del operón de biotina en *E. coli*.^{14,15}

Durante la degradación proteínica en el intestino delgado, las carboxilasas son degradadas a pép-

estar mediada postranscripcionalmente.²¹ Por otro lado, tampoco hay estudios publicados sobre si la biotina regula la expresión génica de la biotinidasa y la holocarboxilasa sintetasa.

Papel de la biotina en la regulación de la expresión génica de algunas enzimas no relacionadas con su ciclo metabólico

Además de su papel como cofactor y probable regulador de la biosíntesis de las carboxilasas, la biotina está involucrada en otras áreas del metabolismo. Se ha descrito que tiene un papel muy importante en la regulación del operón de biotina en *E. coli*.^{22,23} En mamíferos, la biotina juega un papel en la proliferación y diferenciación celular,²⁴⁻²⁷ así como en la regulación de la síntesis de ciertas proteínas, entre las que se encuentran el receptor de la asialoglicoproteína²⁸ y varias enzimas reguladoras del metabolismo de glucosa.²⁹⁻³¹

En el caso de estas últimas enzimas se demostró por primera vez que una vitamina hidrosoluble produce efectos a nivel transcripcional, tanto inductor como supresor, comparable a la acción de ciertas hormonas.

Los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica por biotina se desconocen, sin embargo es posible que existan receptores para biotina que actúen sobre elementos de respuesta que se unan a los promotores de los genes de estas enzimas. Aunque receptores para biotina aún no han sido identificados, se ha detectado la presencia de proteínas que unen biotina en el núcleo celular^{32,33} lo cual sugiere que pueden estar directamente involucradas en la regulación de estos genes.

ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE BIOTINA

Deficiencia adquirida de biotina

La deficiencia de biotina se caracteriza por una reducción en la actividad de las cuatro carboxilasas dependientes de biotina. Clínicamente, los pacientes afectados presentan alopecia, dermatitis, erupción periforificial eritematosa, resequedad e infecciones. Se han documentado diversas alteraciones neurológicas, tales como depresión, somnolencia, dolor muscular y ataxia.^{34,35} La deficiencia en humanos es extremadamente rara. Se ha reportado en pacientes sometidos a alimentación parenteral³⁶ o personas que ingieren grandes cantidades de clara de huevo crudo,

la cual contiene la glicoproteína avidina, que se une con gran afinidad a la biotina, impidiendo su absorción.^{37,38} Sin embargo, trabajos previos en nuestro laboratorio, han reportado que una tercera parte de niños con desnutrición energético-proteínica grave (DEP) presentan deficiencia de biotina.³⁹⁻⁴¹ Utilizando la cromatografía gas-líquida acoplada a la espectrometría de masas se detectó en orina, que estos pacientes tenían patrones metabólicos anormales, similares a los que se observan en enfermos con errores innatos del metabolismo de biotina (ver más adelante); es decir, excretaban algunos ácidos orgánicos como 2-metilcitrato y 3-hidroxiisovalerato.⁴² Esto se corroboró al cuantificar los niveles anormales de biotina en plasma de desnutridos, comparados con los de niños sanos, así como por una menor actividad de las tres carboxilasas mitocondriales en linfocitos de desnutridos. Posteriormente se practicó un estudio doble ciego, en el que un grupo de desnutridos recibió, al azar, un suplemento de biotina, y el otro recibió placebo. Se observó que mientras mayor era la deficiencia al inicio del estudio (menor actividad de las carboxilasas), mayor fue el incremento de estas actividades, pero únicamente en los que recibieron el suplemento de biotina, y no a quienes se administró el placebo. Además, en los pacientes que presentaron manifestaciones clínicas de la deficiencia al inicio del estudio, éstas desaparecieron únicamente en los que recibieron biotina.⁴⁰

Errores innatos del metabolismo de la biotina

En humanos existen enfermedades autosómicas recesivas del metabolismo de biotina que resultan de la alteración de la actividad de la HCS o de la biotinidasa. Los pacientes con estas enfermedades responden satisfactoriamente a dosis farmacológicas de biotina. Basándose en la edad de inicio de los síntomas, la deficiencia de HCS o biotinidasa son generalmente conocidas como forma neonatal o juvenil de deficiencia múltiple de carboxilasas, respectivamente.

Deficiencia de holocarboxilasa sintetasa

La deficiencia múltiple de carboxilasas causada por mutaciones en el gen de la HCS es el trastorno metabólico más severo. En este caso, la capacidad de las células para biotinilar las apocarboxilasas está directamente afectada, mientras que la liberación de la biotina intestinal y el reclutamiento endógeno de la vitamina son normales. El inicio de la enfermedad

ocurre generalmente dentro de las primeras horas después de nacer hasta los 15 meses de edad. Este trastorno produce un desajuste metabólico porque afecta la gluconeogénesis, síntesis y degradación de ácidos grasos, y el catabolismo de diferentes aminoácidos de cadena ramificada. La enfermedad es potencialmente fatal; sin embargo, todas las manifestaciones clínicas y bioquímicas pueden ser revertidas con dosis farmacológicas de biotina.^{43,44}

Deficiencia de biotinidasa

Un defecto en la actividad de la biotinidasa bloquea la liberación de biotina de los alimentos o de su reciclamiento después de la proteólisis de las carboxilasas. Este trastorno resulta en una deficiencia secundaria de biotina, que afecta la actividad de todas las carboxilasas. En estos pacientes el mecanismo de absorción intestinal de biotina y la biotinylation de las apocarboxilasas no se encuentra alterado, lo cual explica el porqué los niños responden rápidamente a la suplementación de biotina. El inicio de la enfermedad varía desde las dos primeras semanas de nacido hasta los dos años de edad. La actividad de biotinidasa en suero de individuos afectados es de 0 a 9% del promedio de la actividad normal.⁴⁵⁻⁴⁷

COMENTARIO FINAL

Esta revisión permite apreciar la enorme importancia y grandes perspectivas que tiene el estudio de la vitamina biotina. Existen grandes implicaciones prácticas en el área de la nutrición y la salud, así como también un gran potencial de aplicaciones a la resolución de problemas metabólicos específicos.

Por otra parte, los estudios descritos muestran que las vitaminas, además de su función ya conocida como cofactores de enzimas, tienen también efectos directos sobre la regulación de la expresión génica de proteínas específicas, por lo que se abre una nueva área para futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Antonio Velázquez Arellano, al Dr. Ignacio Camacho Arroyo y al Dr. Alfonso León del Río por sus críticas y comentarios a la presente revisión.

REFERENCIAS

- Wolf B. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle A, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, Inc. 1995; 3151-77.
- Moss J, et al. The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1971; 35: 321-442.
- Wallace JC, Jitrapakdee S, Chapman-Smith A. Pivuvate carboxylase. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1-5.
- Jitrapakdee S, Wallace JC. Carboxylase function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 1999; 340: 1-16.
- Rosenberg JE. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle A, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, Inc. 1995; 1427-51.
- Mock NI, Mock DM. Biotin deficiency in rats: disturbances of leucine metabolism are detectable early. *J Nutr* 1993; 123: 1493-9.
- Kim KH. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* 1997; 17: 77-99.
- Leon-Del-Río A, Leclerc D, Akerman B, Wakamatsu N, Gravel RA. Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4626-30.
- Leon-Del-Río A, Gravel RA. Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-termini: fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1994; 269: 22964-8.
- Tissot G, Pepin R, Job D, Douce R, Alban C. Purification and properties of the chloroplast form of biotin holocarboxylase synthetase from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1998; 258: 586-94.
- Tissot G, Job D, Douce R, Alban C. Protein biotinylation in higher plants: characterization of biotin holocarboxylase synthetase activity from pea (*Pisum sativum*) leaves. *Biochem J* 1996; 314: 391-5.
- Achuta P, Mistry S. Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *J Sci Ind Res* 1972; 31: 554-63.
- Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y, Chiba Y, Iwamatsu A, Kishino T, Nikiawa N, Matsubara Y, Nanawata K. Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nat Genet* 1994; 8: 122-8.
- Dupuis L, Campeau E, Leclerc D, Gravel RA. Mechanism of biotin responsiveness in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 1999; 66: 80-90.
- Chapman-Smith A, Cronan JE. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *TIBS* 1999; 24: 359-63.
- Weiner D, Wolf B. Biotin uptake, utilization, and efflux in normal and biotin-deficient rat hepatocytes. *Biochem Med Metab Biol* 1991; 46: 344-63.
- León-del-Río A, Velázquez A, Vizcaino G, Robles-Díaz G, González-Noriega A. Association of pancreatic biotinidase activity and intestinal uptake of biotin and biocytin in hamster and rat. *Ann Nutr Metab* 1990; 34: 266-72.
- Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med* 1995; 56: 76-83.
- Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 1-11.
- Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B. Biotinylation of histones following incubation with biocytin. *Clin Chim Acta* 1995; 233: 39-45.
- Rodríguez-Mérida R, Priet-Audande ME, Díaz A, et al. Differential effects of biotin deficiency and replenishment on rat liver pyruvate and propionyl CoA carboxylases and on their mRNAs. *Molec Genet Metab* 1999; 66: 16-23.
- Cronan JE. Expression of the biotin biosynthetic operon of *Escherichia coli* is regulated by the rate of protein biotinylation. *J Biol Chem* 1988; 263: 10332-6.
- Cronan JE. The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell* 1989; 58: 423-9.
- Dakshinamurti K, Chalfour LE, Bhullar RP. Requirement for biotin and the function of biotin in cells in culture. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 447: 38-55.

79

Differential Effects of Biotin Deficiency and Replenishment on Rat Liver Pyruvate and Propionyl-CoA Carboxylases and on Their mRNAs

Rocío Rodríguez-Meléndez,* Martha Elva Pérez-Andrade,* Alejandra Díaz,* Alejandra Deolarte,* Ignacio Camacho-Arroyo,† Isabel Cicerón,* Isabel Ibarra,* and Antonio Velázquez*¹

*Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM and Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico; and †Facultad de Química, UNAM, Mexico City, Mexico

Received October 20, 1998

Although the role of vitamins as prosthetic groups of enzymes is well known, their participation in the regulation of their genetic expression has been much less explored. We studied the effect of biotin on the genetic expression of rat liver mitochondrial carboxylases: pyruvate carboxylase (PC), propionyl-CoA carboxylase (PCC), and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC). Rats were made biotin-deficient and were sacrificed after 8 to 10 weeks, when deficiency manifestations began to appear. At this time, hepatic PCC activity was 20% of the control values or lower, and there was an abnormally high urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid, a marker of biotin deficiency. Biotin was added to deficient primary cultured hepatocytes. It took at least 24 h after the addition of biotin for PCC to achieve control activity and fully biotinylated in the first hour. The enzyme's mass was assessed in liver homogenates from biotin-deficient rats and incubated with biotin to convert the apocarboxylases into holocarboxylases, which were detected by streptavidin blots. The amount of PC was minimally affected by biotin deficiency, whereas that of the α subunits of PCC and of MCC decreased substantially in deficient livers, which likely explains the reactivation and rebiotinylation results. The expression of PC and α PCC was studied at the mRNA level by Northern blots and RT

PCR; no significant changes were observed in the deficient livers. These results suggest that biotin regulates the expression of the catabolic carboxylases (PCC and MCC), that this regulation occurs after the posttranscriptional level, and that pyruvate carboxylase, a key enzyme for gluconeogenesis, Krebs cycle anaplerosis, and fatty acid synthesis, is spared of this control. © 1999 Academic Press

Key Words: biotin deficiency; pyruvate carboxylase; propionyl-CoA carboxylase; 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase; biotinylation; cultured hepatocytes; streptavidin blots.

Biotin has an important role in the metabolism of carbohydrates, lipids, and proteins, as a cofactor of cytosolic acetyl-CoA carboxylase (ACC; EC 6.4.1.2) and mitochondrial pyruvate (PC; EC 6.4.1.1), propionyl-CoA (PCC; EC 6.4.1.3), and 3-methylcrotonyl-CoA (MCC; EC 6.4.1.4) carboxylases (1). Its covalent union to inactive apocarboxylases to render them active is catalyzed by holocarboxylase synthetase (HCS) (2). Until recently, biotin deficiency in humans was considered very rare (3), associated with unusual circumstances like ingestion of large amounts of raw eggs (4) and with biotin-devoid prolonged total parenteral alimentation (5) and hemodialysis (6). We have reported that approximately one-third of children with severe protein-energy malnutrition are biotin-deficient (7), a finding that reveals that this deficiency may be more prevalent than previously realized.

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Instituto Nacional de Pediatría, Apdo. Postal 101-48, México, D.F. 04530, México. Fax: (525) 606-3489. E-mail: velnar@servidor.unam.mx.

We have also reported that reduction of PC and/or PCC activities in lymphocytes is the most sensitive and convenient indicator of this specific deficiency (8), in agreement with Whitehead's previous report on avian liver (9). However, there are conflicting reports on the effects of biotin deficiency and replenishment on carboxylase activities (10-14), and their degree of biotinylation has seldom been studied (10). In the case of other enzymes, in addition to their traditional role as coenzymes or prosthetic groups, their cofactors influence their synthesis (15) or degradation (16), and thus cofactor deficiencies may affect enzyme mass as well as activity. Few studies have actually measured carboxylase mass (10,17,18) and none their mRNAs. On the other hand, there are many reports of an apparent role of biotin in the regulation of the synthesis of many diverse nonbiotinylated proteins, seemingly unrelated to this cofactor (11-13).

In this work we describe previously unreported differences in the reactivation and rebiotinylation rates of various mitochondrial carboxylases, particularly PC and PCC, in cultured rat hepatocytes. These observations led us to study their protein amounts (mass) and their mRNAs.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Biotin-Deficient Diet

Male Wistar rats, age 21 to 28 days (40-60 g), were placed in air-filtered cages and were fed a biotin-deficient diet (ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH). Environmental conditions and light:darkness cycles (12:12 h) were strictly controlled. For each of these animals, one control, under identical conditions, was intraperitoneally injected with 200 μ g biotin in 1.0 M phosphate buffer saline, pH 7.0 (PBS). Urine was quantitatively collected weekly for organic acid analysis, from randomly selected deficient animals. Rats were sacrificed by intraperitoneal injection of 200 μ l of sodium pentobarbital (Pfizer, Mexico City, Mexico), at Weeks 8 to 10 of the experimental diet, when deficiency manifestations began to appear.

Primary Hepatocyte Cultures

Primary cultured hepatocytes were obtained using a technique modified from that of Berry and Friend (19). The liver was perfused with 400 ml of calcium and magnesium-free Hanks' balanced salt

solution (GIBCO, Gaithersburg, MD), and digested with 20 mg collagenase type IV (EC 3.4.24.3, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), in 100 ml Hanks' to which 0.2 mM CaCl_2 was added. Washed hepatocytes (3×10^6) from each biotin-deficient rat were plated in 60-mm culture dishes, precoated with 10 μ g/cm² collagen (Aspid, Mexico City, Mexico), containing minimal essential medium (MEM, GIBCO) without serum; this medium lacks biotin. Six hours later, the medium was changed to remove nonadherent cells, and 50 μ l of a 10 μ M biotin solution in culture medium was added to each dish. The cultures were then incubated for varying times (see Results) and were harvested at each time point. Cultured cells from control animals were similarly processed, except that biotin was added from the time of their initial plating, so that they were in biotin-containing medium at all times, including the 6-h preincubation. Cells were centrifuged at 1500g and frozen at -70°C until use.

Liver Homogenates

The liver was quickly removed, washed with PBS, and homogenized with a polytron (Kinematica, Krienslu) at 4°C for two pulses of 10 s each, with a 30-s pause between them, in 3 vol of the homogenate buffer, pH 7.5 (0.6 M Tris-HCl, 0.15 M KCl, 0.1 mM EDTA) containing 150 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin 10 mg/ml, and leupeptin 10 mg/ml, each from Sigma Chemical Co. The homogenates were then sonicated (Branson Cell Disruptor 200, Danbury, CT) with five sonication pulses of 10 s each, with 1-min pauses between them, followed by centrifugation at 105,000g at 2°C for 10 min. The fat layer was discarded and 1-ml aliquots of the supernatant were stored at -70°C.

Urinary Organic Acid Analysis

Urinary organic acids were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) after solid phase extraction by a method we developed. Urine was collected by placing the animals in metabolic cages. An internal standard (1,12-dodecanedioic acid, Sigma Chemical Co.) was added to a urine volume containing 0.5 μ mol creatinine. The sample was then acidified with 200 μ l of concentrated HCl. The extraction column (Silica Gel Speed, SPE cartridges, Allentown, PA) containing 1.0 g was conditioned with 4 ml of 0.1 M HCl/methanol and dried under vacuum; 4 ml of 50 mM H_2SO_4 /metha-

nol was then added and the column was again vacuum-dried. One sample per cartridge was applied on the top of the column using gentle suction. The column was dried under vacuum for 15 min and the organic acids were eluted with 2 ml of 20% *t*-butanol/chloroform. The eluate was centrifuged and evaporated to dryness. Trimethylsilyl derivatives were formed by the addition 100 μ l of *N,O*-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA; Supelco, Bellefonte) and the samples were heated for 30 min at 60°C. GCMS analysis was performed on a fused silica capillary column 25 m \times 0.25 mm i.d., containing a 0.25- μ m-thick film of methyl 50% phenyl silicone (Quadrex, New Haven, CT). The GCMS system consisted of a Hewlett-Packard HP 5890 series II gas chromatograph and a MSD 5971 mass spectrometer with a workstation (HP Chem Station). The chromatographic parameters were as follows: injector on the splitless mode at 250°C, the injected sample 1 μ l, the initial temperature at 50°C for 5 min, increased to 280°C at 10°C/min and kept at 280°C for 7 min. Helium was used as carrier gas with a flow rate of 1 ml/min. The mass spectrometer was operated at the scan mode, the temperature of transfer line was kept at 280°C, the scan range was from 50 to 650 amu, with a solvent delay of 10 min. After acquisition of the data, the organic acids were identified using a mass spectra library kindly provided by Dr. Lawrence Sweetman. Urinary 3-hydroxyisovalerate, an early and sensitive indicator of biotin deficiency, was quantified from the area of extracted ion chromatograms of ion mass 205, effectively increasing the chromatographic resolution of overlapping peaks in the total ion chromatogram (20,21).

Enzyme Assays

The frozen hepatocytes were thawed, resuspended in 200 μ l of lysis buffer, and sonicated twice on ice (10 s each) with a 20-s pause between each sonication. They were then centrifuged at 750g at 2°C for 10 min, and the supernatant was used. FCC and PC activities were determined using the assays by Burri *et al.* (22) and the enzyme activities were expressed as picomoles of CO₂ fixed per minute per milligram of protein.

Protein Determination

The protein concentration of cultured hepatocyte sonicates was measured by the Bradford assay (23) and of liver homogenates, by the Lowry method (24).

Streptavidin Blot Analysis of Biotinylated Proteins (25)

Cell lysates were added (25 μ g) to an SDS-7.5% polyacrylamide gel and electrophoresed at 70 V overnight. The gel was washed with transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 1.3 mM SDS, 20% methanol) with slow agitation for 30 min and blotted onto a nitrocellulose membrane, 0.45 μ m (Bio-Rad, Hercules, CA), using a semidry transfer cell (Bio-Rad), at 17 V for 30 min. The membrane was incubated with streptavidin-alkaline phosphatase to detect biotinylated proteins (Daniel LeClerc, personal communication). It was soaked in 50 ml of 5% blotting buffer (100 mM boric acid, 47 mM sodium borate, 75 mM NaCl, 5% powder milk) for 1 h, with slow agitation, and washed with 80 ml of replicate buffer (9% NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05% Tween 20). It was then incubated in 15 ml of wash buffer (0.15 M NaCl, 0.25% Triton X-100, 20 mM NaH₂PO₄) and 1.5 μ l streptavidin-alkaline phosphatase (Bio-Rad), at 37°C for 1 h. Afterward, it was washed three times with replicate buffer for 5 min each time, and with 0.15 M Tris-HCl, pH 8.0. Color development was performed by incubation of the membrane in the dark, with slow agitation, in 10 ml A-P buffer (100 mM Tris base, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.5), containing 100 μ l NBT solution (30 mg nitroblue tetrazolium in 1 ml 70% dimethylformamide) and 100 μ l BCIP solution (15 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate in 1 ml 70% dimethylformamide). Once the bands became visible, the membrane was washed with double-distilled water.

Carboxylase Mass Determination

Carboxylase mass was estimated by streptavidin blots after *in vitro* biotinylation of tissue and cell homogenates, to convert apo to holo-carboxylases. Homogenate apocarboxylases were biotinylated by a technique modified from Desjardins and Dakshinamurti (26). The homogenates were thawed and a volume containing 5 μ g protein was added to the reaction mix containing 60 mM Tris, 820 μ M biotin, 10 mM ATP, 0.1 mM EDTA, 0.60 mg/ml bovine serum albumin, 3 mM GSH, 8 mM MgCl₂, pH 7.5, in a final volume of 1 ml. It was incubated at 37°C for 6 h; further amounts of ATP (10 mM) and MgCl₂ (8 mM) were added at the second and fourth hours of incubation (27). The reaction was stopped by the addition of 200 μ l of Laemmli SDS-polyacrylamide gel sample buffer (SDS reducing buffer: 62.5 mM

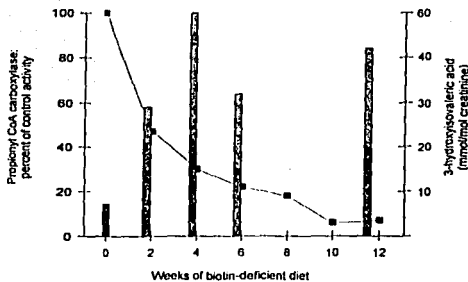


FIG. 1. Enzyme and metabolite changes during biotin deficiency. All animals were fed ad libitum a biotin-deficient diet. Control animals received the same diet but were injected with 200 μ g biotin in saline intraperitoneally once a week, beginning on the day the experimental diet was started. The line depicts the percentage of propionyl-CoA carboxylase activities of deficient rat liver, relative to the control (3200 ± 283 pmol CO₂ fixed min⁻¹ mg⁻¹ protein) at various stages of biotin deficiency. Vertical bars: urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid during the experimental period.

Tris-HCl, pH 6.8, 60% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol; Bio-Rad). Maximal homogenate biotinylation was obtained by optimization of the reagent concentrations and the incubation time. Nonbiotinylated controls were similarly incubated, except that no biotin was added to the reaction mix. Afterward, the biotinylated homogenates and their controls were electrophoresed and streptavidin blot analysis was performed as described above.

RNA Analysis

mRNAs were determined both by Northern blot analysis of poly(A)⁺ RNA hybridized with specific cDNA fragments (28,29) and by RT-PCR analysis (30). Total liver RNA was isolated with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (GIBCO-BRL). RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse-transcribed (RT) to synthesize single-strand cDNA. Ten microliters of RT reaction was subjected to PCR to amplify the PC or PCC gene fragments, and the other 10 μ l of the cDNA was used to amplify simultaneously a fragment of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, which was used as a constitutive expression

control. The sequences of the specific primers unique to the rat PC amplification segment were 5'-(ACT TGT ATG AGC GGG ACT GC)-3' in the sense primer and 5'-(TGA CCT TGA CGG GGA TTG GA)-3' in the antisense. The primers used to amplify the PCC segment were 5'-(GA TGC CAG CTG GGT TGA TGT)-3' in the sense, and 5'-(GAG GCC TTG ATC ATC ACA GG)-3' in the antisense. The 50- μ l PCR included 10 μ l of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 of each dNTP, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 units of *Taq* DNA polymerase. Negative controls without RNA and with nonretrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, the PCR was performed for 30 cycles for PC and for 25 for PCC. The cycle profile for PC, PCC, and GAPDH gene amplification was 95°C, 1 min; 60°C for PC and 56°C for PCC, 1 min each (GAPDH temperatures were chosen according to the corresponding carboxylase gene). A final extension cycle was performed at 72°C. The number of cycles performed was within the exponential phase of the amplification process, previously determined. PCR products were separated on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and subjected to Southern blot analysis. The rat cDNAs probes used were a 2201-bp fragment of the α PCC subunit (from Wayne Fenton, Ph.D., Yale

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

University, New Haven, CT) and a 750-bp fragment of PC (that we obtained by PCR from the GenBank sequence).

RESULTS

Time Course of Biotin Deficiency

Liver PCC activity decreased gradually when a biotin-deficient diet was fed. Figure 1 shows the results of a representative experiment; seven rats

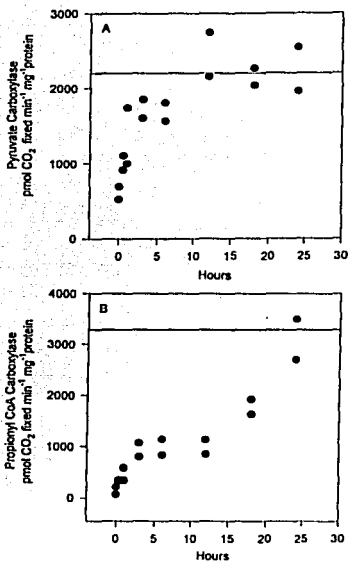


FIG. 2. Effect of biotin (10 μ M) on pyruvate (A) and propionyl-CoA carboxylase (B) activities over 24 h in biotin-deficient primary hepatocyte cultures. Cells were harvested at different times. Each circle represents the enzyme activity of a different culture plate. The horizontal line depicts the average control carboxylase activity in hepatocytes (3200 ± 283 and 2150 ± 79 CO₂ fixed min⁻¹ mg⁻¹ protein for PCC and PC, respectively).

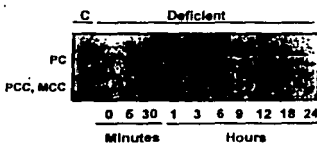


FIG. 3. A representative streptavidin blot of holo-carboxylases at different times after the addition of 10 μ M biotin to biotin-deficient primary hepatocyte cultures. Cells were harvested at different times. They were sonicated, electrophoresed on 7.5% SDS-polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes. They were then incubated with streptavidin-alkaline phosphatase and were developed with NBT-BCIP solution to detect biotinylated proteins. C: control homogenate.

were sacrificed at different times after being fed the deficient diet. The animals presented clear deficiency signs, including low body weight, hair loss, conjunctivitis, periorificial skin rash, and ataxia, at or shortly after the eighth week of the experimental diet, when PCC activity was 20% of that of the control or lower. On the other hand, the urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid increased substantially after the third week of the deficient diet.

Effects of Biotin Addition to Deficient Cultured Hepatocytes

When biotin was added to deficient primary cultures, PC activity quickly increased and almost reached control levels at 2 h (Fig. 2A). In contrast, PCC activity rose much more slowly, and it took 24 h to achieve normal activity (Fig. 2B). Streptavidin blot analysis of biotinylated proteins showed similar results (Fig. 3). The band corresponding to holo-PC from deficient cells reached an intensity similar to that of the control in 1 h, whereas the holo- α -PCC intensity was still below that from the control at 24 h after biotin addition. There was no substantial change of the bands from control cells after biotin addition to the cultures (results not shown). Since the biotin-binding subunits of the PCC and MCC have similar molecular weights (72,000 and 76,000 Da, respectively), they separate poorly in SDS-PAGE, even at the low (7.5%) gel concentrations used. Thus, α -MCC was also very slowly biotinylated. Due to the electrophoretic running time, acetyl-CoA carboxylase, whose molecular weight is much higher (260,000 Da), was not readily observed.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

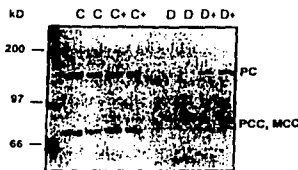


FIG. 4. Carboxylase mass analysis by streptavidin blots after *in vitro* biotinylation to convert apo to holo-carboxylases. Control and deficient liver homogenates were incubated with biotin and ATP, as described under Materials and Methods, and electrophoresed, and streptavidin blots were prepared. Lane 1, molecular weight standards. Control homogenates without (C) and with (C+) biotin. Deficient homogenates without (D) and with (D+) biotin.

Carboxylase Analysis by Streptavidin Blots after *In Vitro* Biotinylation

To explore possible mechanisms for the long lapse required for PCC and MCC activation, we estimated the mass of the enzyme proteins using streptavidin as a probe, after converting the apocarboxylases into holoenzymes by biotinylation of hepatic homogenates. We first defined the conditions (biotin, ATP and protein concentrations, and incubation time; see Materials and Methods) to achieve bands as intense as those in the control homogenates similarly treated (results not shown). Under these conditions, PC was as abundant in the deficient homogenates as in the control (Fig. 4). In contrast, bands corresponding to PCC and MCC were barely observed.

Study of Liver PCC and PC mRNAs

There were no differences in the amounts of either mRNA between deficient and control livers, as studied by RT-PCR (Fig. 5). In all the amplifications, single bands of 750, 380, and 480 bp were observed, corresponding to the expected size fragments of PC, PCC, and GAPDH cDNAs, respectively. The identity of each PCR product was confirmed by Southern blot analysis. Similar results were obtained on Northern blots after poly(A)⁺ RNA purification (not shown).

DISCUSSION

Hepatic propionyl-CoA carboxylase showed a behavior very different from that of pyruvate carbox-

ylase when biotin was added to deficient primary hepatocyte cultures. It took nearly 24 h after biotin addition for the former enzyme to achieve both a specific activity and a degree of biotinylation similar to control levels. In contrast, PC became active and fully biotinylated in the first 1-2 h. In this regard there are conflicting data in the literature. Our results are similar to those of Shriver *et al.* (10), who observed more rapid reactivation of liver PC than PCC (and MCC) after injecting biotin to deficient rats. Others studied only one carboxylase at a time, with similar results, PC being restored in only 1-2 h (11) and PCC requiring 12 h (12). Other authors, however, reported slow reactivation of both carboxylases, after the injection of biotin to rats (13) or after its addition to deficient rat primary cultured hepatocytes (14). These discrepancies may reflect differences in the experimental approaches or in a difficult-to-identify biological factor.

To further explore our results, we estimated the enzyme mass after converting the apocarboxylases into holo-carboxylases, by incubating the deficient homogenates with biotin and ATP, so that their total amounts could be detected by streptavidin blots as an alternative to immunoblots, since anti-carboxylase antibodies were not available. In this regard, it is widely known that the biotin-streptavidin union is as specific as the antigen-antibody union. Al-

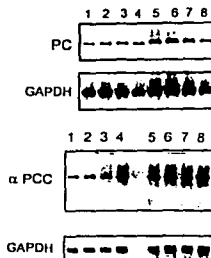


FIG. 5. RT-PCR analysis of PCC and PC mRNAs from control and biotin-deficient livers. Total RNA was reverse-transcribed (RT) and amplified by PCR using specific primers for rat PCC, PC, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). PCR products were separated on 2% agarose gel and subjected to Southern blot analysis. Lanes 1-4, control; and lanes 5-8, deficient rat livers.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

though the activities and degree of biotinylation of carboxylases are severely reduced during biotin deficiency, PC mass was only minimally affected by biotin deficiency; it was biotinylated to near control levels in deficient liver homogenates, indicating a negligible loss of its apoenzyme. This result likely explains the rapid increase of PC activity and of its biotinylated form when the vitamin was added to the deficient cultures. On the other hand, since only a small amount of holoenzyme was formed after homogenate biotinylation, the apo- α PCC mass probably was severely reduced during the vitamin deficiency. This would explain the slow reactivation and rebiotinylation of PCC after the addition of biotin to deficient hepatocytes. This long time lapse was presumably required for increased synthesis and/or decreased breakdown, in order for the enzyme amount to reach control levels. These results contrast with a previous report by Taroni and Rosenberg (18), who did not find a decreased amount of apo- α PCC in the buffalo rat liver (BRL) 3A cell line. However, there are well-known differences between permanent cell lines and primary cell cultures that may account for this dissimilarity. MCC behaved similarly to PCC with respect to *in vivo* and *in vitro* biotinylation, although we did not measure its activity in the biotin-supplemented cultures.

There are increasing examples of vitamins modulating the transcriptional patterns of selected genes in higher organisms, such as vitamin D (31,32), retinol and retinoic acid (33-35), and folate (36). To explore whether such modulation was the mechanism for the reduction of PCC mass during biotin deficiency, we compared its mRNAs levels to those of PC. No differences in their amounts were observed between deficient and control livers. Therefore, the reduction in PCC mass is likely to have been post-transcriptionally mediated. Biotin-free apo α PCC (and α MCC) might be more prone to degradation than their holo, biotin-containing forms, as occurs with other apoenzymes (16). Alternatively, biotin deficiency may reduce the synthesis of PCC and MCC compared to that of PC.

To our knowledge, the time of increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid (3-HIV), a well-known marker of biotin deficiency (37) derived from the leucine catabolic pathway, had not been previously studied in relation to the kinetics of decrease in carboxylases activities and to the onset of deficiency symptoms. It is interesting that 3-HIV is abnormally excreted (and accumulated) much ear-

lier than substantial hepatic enzyme or phenotypic changes. If this accumulation is indeed the consequence of metabolic blocks caused by biotin deficiency, it means that other biotin-dependent reactions are rate-limited before both the liver PCC controlled step and those whose blocks are critical for the deficiency manifestations.

This is the first time that a differential effect of biotin on the expression of mitochondrial carboxylases has been observed. Our results suggest that biotin regulates the expression of the catabolic carboxylases (PCC and MCC), that this regulation occurs at the posttranscriptional level, and that pyruvate carboxylase, a key enzyme for gluconeogenesis, Krebs cycle anaplerosis, and fatty acid synthesis, is spared of this control.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr. Alfonso León-del-Río for his helpful advice and continued support. Dr. Wayne Fenton kindly gave us the cDNA of propionyl-CoA carboxylase. Dr. Roy Gravel suggested the use of streptavidin blot analysis after *in vitro* biotinylation to determine the carboxylase mass by streptavidin biotin. Dr. Silvestre Frenk carefully read the manuscript and contributed with many useful comments and suggestions. Q.F.B. Norma Vazquez was very helpful in the optimization of the assay for carboxylase mass determination. This work was supported by research grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (4054M) and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (PAPIIT IN217196).

REFERENCES

1. Moss J, Lane MD. The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol* 35:321-398, 1971.
2. Achuta P, Mistry S. Synthesis of biotin-dependent carboxylases from their apoproteins and biotin. *J Sci Ind Res* 31: 554-663, 1972.
3. Bonjour JP. Biotin in human nutrition. *Ann NY Acad Sci* 447:97-104, 1985.
4. Scott D. Clinical biotin deficiency (egg white injury) report of a case with some remarks on serum cholesterol. *Acta Med Scand* 162:69-72, 1951.
5. Mock DM, DeLorme AA, Liebman WM, Sweetman L, Baker H. Biotin deficiency: An unusual complication of parental alimentation. *N Engl J Med* 304:820-823, 1991.
6. Yatasis II. Biotin in the management of uremic neurological disorders. *Nephron* 36:183-185, 1984.
7. Velázquez A, Terán M, Báez A, Gutiérrez J, Rodríguez R. Biotin supplementation affects lymphocyte carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr* 61:385-391, 1995.
8. Velázquez A, Zamudio S, Báez A, Mungua-Corral Z, Ranget-Peniche B, Carrasco A. Indicators of biotin status: A

PCC

86

- study of patients on prolonged total parenteral nutrition. *Eur J Clin Nutr* 43:11-16, 1990.
9. Whitehead CC. Assessment of biotin deficiency in animals. *Ann NY Acad Sci* 447:86-96, 1985.
 10. Shriver BJ, Kaman SC, Alfred JB. Depletion and repletion of biotinyl enzymes in liver of biotin-deficient rats: evidence of a biotin storage system. *J Nutr* 123:1140-1149, 1993.
 11. Doodhar AD, Mistry SP. Gluconeogenesis in biotin deficiency: *In vivo* synthesis of pyruvate decarboxylase in biotin deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 34: 755-759, 1969.
 12. Kosow DP, Lane MD. Restoration of biotin-deficiency-induced depression of propionyl carboxylase activity in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 4:92-95, 1961.
 13. Chiang GS, Mistry SP. Activities of pyruvate carboxylase and propionyl CoA carboxylase in rat tissues during biotin deficiency and restoration of the activities after biotin administration 1-3 (38035). *Proc Soc Exp Biol Med* 146:21-24, 1974.
 14. Weiner D, Wolf B. Biotin uptake, utilization, and efflux in control and biotin-deficient rat hepatocytes. *Biochem Med Metab Biol* 46:344-363, 1991.
 15. Dakshinamurti K. Vitamin receptors: Vitamins as ligands in cell communication. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1994.
 16. Schimke RT, Sweeny EW, Berlin CM. The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrrolase. *J Biol Chem* 240:322-331, 1965.
 17. Ahmad PM, Ahmad F. Mammalian pyruvate carboxylase: effect of biotin on the synthesis and translocation of apoenzyme into 3T3-L1 adipocyte mitochondria. *FASEB J* 5:2482-2485, 1991.
 18. Taroni F, Rosenberg LE. The precursor of the biotin-binding subunit of mammalian propionyl-CoA carboxylase can be translocated into mitochondria as apo- or holoenzyme. *J Biol Chem* 266:13267-13271, 1991.
 19. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43:506-520, 1969.
 20. Gates SC, Dendramis N, Sweetley CC. Automated metabolic profiling of organic acids in human urine. I. Description of methods. *Clin Chem* 24:1674-1679, 1978.
 21. Hoffmann G, Aramaki S, Blum-Hoffmann E, Nyhan WL, Sweetman L. Quantitative analysis for organic acids in biological samples: Batch isolation followed by gas chromatographic-mass spectrometry analysis. *Clin Chem* 35: 587-595, 1989.
 22. Berry BJ, Sweetman L, Nyhan WL. Heterogeneity of holocarboxylase synthetase in patients with biotin responsive multiple carboxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 34:326-337, 1985.
 23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
 24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 260-264, 1951.
 25. León-del-Río A, Gravel R. Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha-subunit expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269:22964-22968, 1994.
 26. Dejarjardis P, Dakshinamurti KD. Acetyl-CoA holocarboxylase synthesis in biotin-deficiency rat adipose tissue. *Arch Biochem Biophys* 142:292-298, 1971.
 27. Kosow D, MD L. Propionyl apocarboxylase activation catalyzed by cell-free enzyme extracts. *Biochem Biophys Res Commun* 5:191-195, 1961.
 28. Kingston RE. Preparation of poly(A)⁺ RNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol 1, Suppl 21 (Ausbel F.M., et al., Eds.). New York: Wiley, pp. 4.5.1-4.5.3, 1996.
 29. Brown T. Analysis of RNA by Northern and dot blot hybridization. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol 1, Suppl 23 (Ausbel F.M., et al., Eds.). New York: Wiley, pp. 4.9.1-4.9.14, 1996.
 30. Camacho-Arroyo I, Pasapera A, Cerbón MA. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett* 214:25-28, 1996.
 31. Haussler MR. Vitamin D receptors: Nature and function. *Annu Rev Nutr* 6:527-62, 1986.
 32. Lino J, Ozone K, Sone T, McDonnell DP, Pike JW. Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9751-9755, 1990.
 33. Neji S, Yamami T, Koyama E, Nohno T, Taniguchi S. Spatial and temporal expression pattern of retinoic acid receptor genes during mouse bone development. *FEBS Lett* 257:93-96, 1989.
 34. Osami N, Neji S, Nohno T, Koyama E, Doi H, Eto K, Taniguchi S. Expression of retinoic acid receptor genes in neural crest-derived cells during mouse facial development. *FEBS Lett* 264:71-74, 1990.
 35. Smith SM, Eichele G. Temporal and regional differences in the expression pattern of distinct retinoic acid β -receptor transcripts in the chick embryo. *Development* 3:245-252, 1991.
 36. Wang X, Shen F, Freisheim JII, Gentry LE, Ratnam M. Differential aerospecificities and affinities of folate receptor isoforms for folate compounds and antifolates. *Biochem Pharmacol* 44:1898-1901, 1992.
 37. Mock NI, Malik MI, Stumbo FJ, Bishop WP, Mock DM. Increased urinary excretion of 3-hydroxyisovaleric acid and decreased urinary excretion of biotin are sensitive early indicators of decreased biotin status in experimental biotin deficiency. *Am J Clin Nutr* 65:951-958, 1997.



EL Grupo de Estudios del Nacimiento, A.C.

Otorga

el Premio de Investigación sobre Defectos al Nacimiento en la categoría de Investigación Biomédica

à: Dra. Rocío Rodríguez Meléndez

por el trabajo titulado

Efectos diferenciales de la deficiencia y la administración de biotina en las piruvato y propil-CoA carboxilasas del hígado de ratá y en sus mRNAs.

México, D.F., a 26 de noviembre del 2001.

LIC. ANTONIO LÓPEZ DE SILANES
Presidente

SRA. MARTA DE FOX
Esposa del C. Presidente de los
Estados Unidos Mexicanos

DR. FABIO SALAMANCA G.
Coordinador del Premio

Testigos de Honor

DR. JULIO FRENK MORA
Secretario de Salud

APENDICE E

Premios recibidos por esta investigación

58

Instituto Nacional de Pediatría

Otorga el presente

DIPLOMA

a: Rodríguez-Meléndez R.; Camacho-Arroyo I.; Pérez-Andrade M. E.; Velázquez-Arellano A.

por haber obtenido el *Primer Lugar* en *Investigación Básica* con el trabajo:

**" EL PAPEL DE LA BIOTINA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE LA
PROPIONIL CoA CARBOXILASA (PCC) Y LA HOLOCARBOXILASA SINTETASA (HCS) EN HÍGADOS
NORMALES Y DEFICIENTES DE BIOTINA "**

Presentado en el

VII Foro Anual de Investigación Científica

México D.F. Octubre de 1997

Carnevale

Dra. Alessandra Carnevale Cantoni
Directora General

Rivera

Dr. Roberto Rivera Luna
Subdirector General de Investigación